



TECHNISCHE  
UNIVERSITÄT  
DARMSTADT

ULB

# **Schwefel und Persulfid (Di-) Oxygenasen: Biochemische, spektroskopische und strukturelle Eigenschaften und deren Einfluss auf die Reaktionsmechanismen**

Rühl, Patrick  
(2020)

DOI (TUprints): <https://doi.org/10.25534/tuprints-00011493>

Lizenz:



CC-BY-SA 4.0 International - Creative Commons, Attribution Share-alike

Publikationstyp: Ph.D. Thesis

Fachbereich: 10 Department of Biology

Quelle des Originals: <https://tuprints.ulb.tu-darmstadt.de/11493>

---



TECHNISCHE  
UNIVERSITÄT  
DARMSTADT

# **Schwefel und Persulfid (Di-) Oxygenasen**

**Biochemische, spektroskopische und strukturelle Eigenschaften  
und deren Einfluss auf die Reaktionsmechanismen**

**vom Fachbereich Biologie  
der Technischen Universität Darmstadt**

zur Erlangung des Grades  
Doctor rerum naturalium  
(Dr. rer. nat.)

**Dissertation  
von Patrick Rühl**

Erstgutachter: PD Dr. Arnulf Kletzin  
Zweitgutachterin: Prof. Dr. Felicitas Pfeifer

Darmstadt 2020

---

---

Rühl, Patrick: Schwefel und Persulfid (Di-) Oxygenasen: Biochemische, spektroskopische und strukturelle Eigenschaften und deren Einfluss auf die Reaktionsmechanismen

Darmstadt, Technische Universität Darmstadt

Jahr der Veröffentlichung auf TUprints: 2020

Tag der mündlichen Prüfung: 26.06.2020

URN: urn:nbn:de:tuda-tuprints-114938

Veröffentlicht unter CC BY-SA 4.0 International

<https://creativecommons.org/licenses/>

---

---

*Was wir wissen, ist ein Tropfen -  
was wir nicht wissen, ein Ozean.*  
Isaac Newton

---



---

---

# Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung .....	1
-----------------------	---

## Kapitel 1 - Allgemeine Einleitung

1.1	Elementarer Schwefel im biogeochemischen Kreislauf.....	4
1.2	Schwefel-oxidierende Enzyme .....	5
1.2.1	Persulfid Dioxygenasen.....	6
1.2.2	Schwefel Oxygenasen Reduktasen .....	9
1.3	Bakterielle Schwefeloxidation .....	16
1.4	Schwefeloxidation in Archaea .....	22
1.5	Ziele der Arbeit und Kapitelübersicht .....	24

## Kapitel 2 - Material & Methoden

### Material

2.1	Chemikalien.....	28
2.2	Mikroorganismen .....	30
2.3	Plasmide .....	30
2.4	Synthetische Oligonukleotide .....	31
2.5	Enzyme, Kits und Größenstandards.....	33
2.6	Medien.....	33
2.7	Puffer und Lösungen .....	34

### Methoden

2.8	Mikrobiologische Methoden	
2.8.1	Kultivierung von <i>E. coli</i> .....	37
2.8.2	Kultivierung von <i>Tv. paradoxus</i> .....	37
2.8.3	Phasenkontrast-Mikroskopie .....	37
2.8.4	Transmissions-Elektronenmikroskopie (TEM) .....	37
2.8.5	Raster-Elektronenmikroskopie (SEM) .....	37
2.9	Molekularbiologische Methoden	
2.9.1	Ortsgerichtete Mutagenese .....	37
2.9.2	Agarose-Gelelektrophorese .....	39
2.9.3	Transformation von <i>E. coli</i> und Analyse von Transformanten.....	39
2.9.4	RNA-Isolation aus <i>Tv. paradoxus</i> .....	39
2.9.5	Quantitative Reverse-Transkriptase PCR (qRT PCR) .....	40
2.9.6	Heterologe Genexpression in <i>E. coli</i> .....	41
2.10	Biochemische Methoden	
2.10.1	Reinigung rekombinanter SOR/PDO aus <i>E. coli</i> .....	41
2.10.2	Proteinquantifizierung.....	42
2.10.3	Natriumdodecylsulfat Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) ...	42
2.10.4	Polyacrylamid-Gelelektrophorese kleiner Nukleinsäuren.....	42
2.10.5	Häm-Färbung .....	43
2.10.6	MalPEG Gel Shift Assay .....	43
2.10.7	Western-Analyse.....	43
2.10.8	Native Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	43
2.10.9	Gelpermeationschromatographie.....	44
2.10.10	Enzym-Aktivitätstests .....	44

2.10.11	GSSH-Synthese.....	45
2.10.12	Polysulfid-Synthese .....	46
2.10.13	Kolorimetrische Bestimmungen von Schwefelverbindungen und Eisen .	46
2.10.14	HPLC-Analysen.....	47
2.10.15	Massenspektrometrie (MS) .....	48
2.10.16	SWATH-LC/MS/MS.....	49
2.10.17	Inhibitionsstudien.....	51
2.10.18	Proteindenaturierungs-Studien .....	51
2.10.19	Proteinstabilitäts-Messungen .....	51
2.10.20	Bestimmung von Bindungskonstanten .....	52
2.11	Spektroskopische Methoden	
2.11.1	UV-Vis Spektroskopie.....	52
2.11.2	CD Spektroskopie .....	52
2.11.3	<i>Stopped-Flow</i> Spektroskopie.....	52
2.11.4	EPR Spektroskopie.....	53
2.12	Methoden zur Strukturbestimmung	
2.12.1	Kristallisation der <i>Tp</i> SOR und der <i>Ac</i> PDO .....	53
2.12.2	Datensammlung und Prozessierung von Röntgenstrukturdaten.....	54
2.12.3	Kristallstrukturbestimmung .....	54
2.12.4	EM Probenvorbereitung.....	55
2.12.5	EM Datensammlung .....	55
2.12.6	Bildverarbeitung.....	55
2.12.7	Strukturmodell-Analyse .....	55
2.12.8	Homologie-Modellierung.....	57

### Kapitel 3 - Die Persulfid Dioxygenase aus *Acidithiobacillus caldus*

Einleitung .....	60
Ergebnisse	
3.1 Biochemische Charakterisierung der <i>Ac</i> PDO .....	63
3.2 Kristallisation und Strukturanalyse der <i>Ac</i> PDO .....	66
3.3 Oligomerisierungszustände der <i>Ac</i> PDO .....	70
3.4 Charakterisierung des katalytischen Eisenzentrums .....	72
3.5 Mutationsanalyse des aktiven Zentrums und der sekundären Koordinationssphäre .....	76
3.6 Substratbindungsanalysen.....	80
3.7 Disulfidbrücke und Cystein-Modifikationen .....	84
3.8 Inhibitionsstudien der <i>Ac</i> PDO .....	90
Diskussion.....	92

### Kapitel 4 - Biochemische Charakterisierung der SOR aus *Tv. paradoxus*

Einleitung .....	106
Ergebnisse	
4.1 Temperaturoptimum und Thermostabilität.....	109
4.2 SOR-Produktstöchiometrie .....	112
4.3 Mutagenesestudien .....	115
Diskussion.....	119

---

## Kapitel 5 - Strukturbestimmungen von SORs

Einleitung .....	124
Ergebnisse	
5.1 Kristallisation der <i>Tp</i> SOR .....	127
5.2 Vergleichende SOR Kristallstrukturanalyse .....	131
5.3 Das katalytische Zentrum .....	134
5.4 Kryo-EM-Strukturen der <i>Aa</i> SOR und der <i>Tp</i> SOR.....	137
Diskussion .....	146

## Kapitel 6 - Substrat- und Produktwege von SORs

Einleitung .....	154
Ergebnisse	
6.1 Das Holoenzym .....	156
6.2 Der Tetramerkanal .....	157
6.3 Kanäle und Tunnel zum aktiven Zentrum.....	158
6.4 Der Trimerkanal.....	161
6.5 Identifizierung möglicher Substratbindungsstellen .....	162
Diskussion .....	168

## Kapitel 7 - Vergleichende RNA- und Proteomanalysen von *Tv. paradoxus*

Einleitung .....	174
Ergebnisse	
7.1 Wachstumsparameter und Schwefeleinlagerung.....	175
7.2 Transkriptionsanalysen .....	177
7.3 Proteomanalysen.....	179
Diskussion .....	194

## Kapitel 8

Schlussfolgerungen und Ausblick .....	199
Literaturverzeichnis.....	206
Anhang.....	223
Abkürzungsverzeichnis .....	225
Beiträge anderer.....	229
Publikationen .....	230
Konferenzbeiträge .....	231
<i>Curriculum Vitae</i> .....	232
Danksagung .....	233
Ehrenwörtliche Erklärung.....	234

---

---

---

## Zusammenfassung

---

Als Schwefel (Di-)Oxygenasen waren ursprünglich zwei Enzymklassen beschrieben worden, die elementaren Schwefel ( $S^0$ ) mit Sauerstoff ( $O_2$ ) oxidieren. Sie gehören zu der sehr viel größeren Gruppe sogenannter „Schwefel-oxidierender Enzyme“, unter denen alle Enzyme zusammengefasst sind, die reduzierte Schwefelverbindungen oxidieren. Die hier untersuchten Schwefel Oxygenasen Reduktasen (SORs) und Persulfid Dioxygenasen (PDOs) ähneln sich darin, dass sie mononukleare nicht-Häm Eisenatome besitzen, welche die  $S^0$ - bzw. Persulfid-Oxidation mit  $O_2$  in den jeweiligen aktiven Zentren katalysieren. Die vorliegende Arbeit hatte das Ziel, Vertreter beider nicht verwandter Enzymklassen auf molekularer und struktureller Ebene im Detail zu charakterisieren, um Rückschlüsse auf generelle Funktionsweisen und die Reaktionsmechanismen zu erhalten.

PDOs kommen in der Natur ubiquitär vor und katalysieren die sauerstoffabhängige Oxidation des Sulfanschwefels von Glutathionpersulfid (GSSH), das aus reduziertem Glutathion (GSH) durch Sulfanschwefel-Transferasen oder auch spontan mit  $S^0$  entsteht. Reaktionsprodukte der PDOs sind Sulfit und GSH. Das *pdo*-Gen aus *Acidithiobacillus caldus* (AcPDO) wurde heterolog in *E. coli* exprimiert, mit durchschnittlichen Proteinausbeuten von  $\approx 27,9$  mg/l LB-Medium. Der mittlere Eisengehalt der rekombinanten Proteine betrug 0,77 nmol Fe/nmol Protein bei einer Enzymaktivität von 61,0 U/mg Protein bei 40 °C und pH 7,5. Enzymtests mit steigenden GSH-Konzentrationen und  $S^0$  als Co-Substrat resultierten in einer Michaelis-Menten-Kinetik mit  $K_M$  und  $K_{cat}$  von 0,5 mM und 181 s<sup>-1</sup>, wohingegen steigende GSSH-Konzentrationen einen sigmoidalen Kurvenverlauf mit einem Hill-Koeffizienten von 2,3 zur Folge hatte, was auf positive Kooperativität der Enzymuntereinheiten hindeutet. Die AcPDO-Röntgenkristallstruktur wurde mit einer Auflösung von 2,07 Å aufgeklärt, deren asymmetrische Einheit aus einem Homodimer besteht. Die Kristallpackung der Einheitszelle und Gelfiltration legen eine Tetramerisierung nahe, welche über Oberflächenladungen und hydrophobe Interaktionen vermittelt wird. Das katalytische *high-spin* Eisenatom wird in einer 2-His-1-Carboxylat-Triade ligiert und besitzt ein Reduktionspotential  $E_0'$  von -234 mV. Spektroskopische Analysen zeigten charakteristische Ladungstransfer-Spezies nach Inkubation mit GSSH, welche auf Fe-O<sub>2</sub> und Fe-O<sub>2</sub>-SSR-Intermediate zurückzuführen sind und legten die Bildung eines Fe(IV)-Reaktionsintermediates nahe. In einer ersten, umfassenden PDO-Mutagenese-Studie wurden insgesamt zehn funktional wichtige Aminosäuren identifiziert, von denen D<sub>61</sub>, H<sub>62</sub> und H<sub>171</sub> konserviert und essentiell sind. Sie befinden sich in zwei *active site loops* in unmittelbarer Nähe zum Eisenzentrum und sind vermutlich über Säure-Base-katalysiertes Protonen-*Shuffling* direkt an der homolytischen Spaltung eines zyklischen Peroxo-Reaktionsintermediates beteiligt. Substratbindungsanalysen gaben einen  $K_D$ -Wert von 113  $\mu$ M für die GSSH Bindung an, wobei eine Alanin-Variante des in der Substratbindungstasche befindlichen R<sub>139</sub> einen starken Abfall der Enzymaktivität bewirkte und nicht mehr in der Lage war, Substrat zu binden. Oberflächen-Cysteine befinden sich in beachtlichen Abstand zum aktiven Zentrum ( $>16$  Å) und bilden in der AcPDO-3D-Struktur eine Disulfidbrücke aus. Gel-Shift-Assays zeigten, dass es sich um ein redoxaktives Zentrum handelt. Die Disulfidbrücke stabilisiert eine  $\alpha$ -Helix und koordiniert über N<sub>221</sub> die Position von D<sub>61</sub> und H<sub>62</sub>. Alanin-Varianten der beiden Cysteine besaßen verbleibende Enzymaktivitäten von  $<2$  % und zeigten nach GS(S)H-Inkubation massenspektrometrisch eine Glutathionylierung am jeweils verbleibenden Cystein. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Protein-S-Glutathionylierung als Schutzmechanismus gegen unkontrollierte Thiol-Oxidation und dem damit verbundenen Verlust der Enzymaktivität fungiert.

SORs katalysieren eine sauerstoffabhängige Disproportionierungsreaktion von  $S^0$  mit Sulfit und Sulfid als Reaktionsprodukte. Normalerweise besitzen SORs Produktstöchiometrien zwischen 4:1 und 10:1, wobei Oxygenase- und Reduktase-Aktivitäten bislang nicht voneinander getrennt werden konnten. Sequenzvergleiche zeigten, dass die SOR aus dem mesophilen Bakterium *Thioalkalivibrio paradoxus* ARh1 (*TpSOR*) tief in SOR-Dendrogrammen abzweigt. SWATH-LC/MS/MS-Analysen zeigten, dass die *TpSOR* – im Gegensatz zu PDOs – in großen Mengen in Kulturen mit Thiosulfat bzw. Thiocyanat als Energiequelle gebildet wird. Sie scheint, zusammen mit revers arbeitender Sulfitreduktase, Adenylylsulfatreduktase und periplasmatischen Flavocytochromen *c*, eine zentrale Rolle im oxidativen Schwefelmetabolismus von *Tv. paradoxus* einzunehmen, wobei deren Abundanz eng mit dem Auf- und Abbau intrazellulärer Schwefelkugeln korreliert. Die *TpSOR* wurde rekombinant in *E. coli* produziert, mit durchschnittlichen Proteinausbeuten von  $\approx 30,9$  mg/l LB-Medium. Die mittlere Oxygenase-Aktivität betrug 323 U/mg Protein bei 80 °C und pH 9. Der Schmelzpunkt der *TpSOR* wurde bei 81 °C ermittelt und befindet sich damit nahe des Temperaturoptimums. Die *TpSOR*-Reduktase-Aktivität betrug in kolorimetrischen Quantifizierungen der Reaktionsprodukte maximal 0,03 U/mg Protein, was  $< 1$  % im Vergleich zu allen anderen SORs und einem Oxygenase/Reduktase-Verhältnis von  $\approx 10\,000:1$  entspricht. Um reproduzierbare Produktstöchiometrien in SORs zu ermitteln, wurde ein HPLC-gekoppelter SOR-Enzymtest entwickelt. Quantifizierungen der Reaktionsprodukte resultieren in Produktverhältnissen von 30:1 für die *TpSOR*, wohingegen SORs aus dem hyperthermophilen Archaeon *Acidianus ambivalens* (*AaSOR*) und dem mesophilen Bakterium *Halotheobacillus neapolitanus* für die  $S^0$ -Disproportionierungsreaktion erwartete Verhältnisse von nahezu 1:1 aufwiesen. Dementsprechend scheint die *TpSOR* eine Schwefel Oxygenase mit einer untypisch geringen Reduktase-Aktivität darzustellen. Die *TpSOR*-Röntgenkristallstruktur wurde mit einer Auflösung von 2,84 Å aufgeklärt und zeigte einen SOR-typischen Aufbau. Das mononukleare Eisenzentrum befindet sich in einer deformierten oktaedrischen Koordinationssphäre mit einem Reduktionspotential  $E_0'$  von -252 mV und liegt, im Unterschied zur *AaSOR*, nach Katalyse oxidiert vor. Unterschiede im Vergleich zu anderen SORs ergeben sich in der Konstitution der *active site pocket*, welche in der *TpSOR* durch einen interhelikalen *loop* unterbrochen ist. Die verkleinerte Bindungstasche schließt lediglich das für die Reaktion essentielle C<sub>44</sub> ein und könnte Reaktionsprodukte oder -intermediate vor chemischer Oxidation/Reduktion schützen. Darüber hinaus wurde in allen drei SORs mittels Software-gestützten Tunnelanalysen ein zuvor unbekannter Zugang zum aktiven Zentrum identifiziert, welcher über das essentielle Cystein eine zweite Kavität mit der *active site pocket* verbindet. *AaSOR*- und *TpSOR*-Kryo-EM-Strukturen wurden mit Auflösungen von 2,5 bzw. 3,1 Å aufgeklärt und legen nahe, dass in der Kavität ein zweites Metall gebunden sein könnte. Zusätzliche Elektronendichten an zwei semi-essentiellen *active site pocket* Cysteinen in der *AaSOR*-Kryo-EM-Struktur deuten darüber hinaus auf mechanistisch notwendige Schwefel-Polymerisierungs- und/oder -Depolymerisierungsreaktionen hin.

Der Vergleich von SORs und PDOs zeigte, dass sich deren Strukturen und Reaktionsmechanismen fundamental unterscheiden, obwohl beide mononukleare Eisenzentren besitzen und Sulfanschwefel mit Sauerstoff oxidieren. Die *Tv. paradoxus* Proteomanalyse verdeutlichte darüber hinaus, dass die SOR auch im dissimilatorischen Schwefelstoffwechsel mesophiler Bakterien genutzt wird, während die *in vivo*-Rolle der PDOs in chemolithoautotrophen Bakterien weniger klar ist: Möglicherweise sind sie wichtiger für die Redox-Balance im Cytoplasma als für die oxidative Energiekonversion.

# KAPITEL 1

## Allgemeine Einleitung

---

Vom biogeochemischen Schwefelkreislauf zur  
mikrobiellen Schwefeloxidation



*SOLFATARISCHE FUMAROLE UND HEIßE QUELLE IN CALDEIRA VELHA,  
SÃO MIGUEL, AZOREN, PORTUGAL (BILD. A. KLETZIN)*



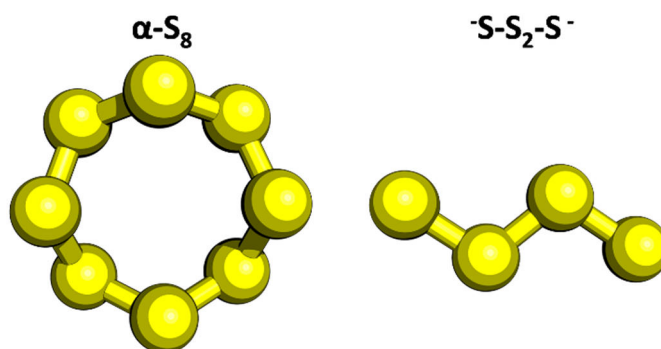
## 1.1 Elementarer Schwefel im biogeochemischen Kreislauf

Schwefel spielt eine elementare Rolle in der Co-Evolution von Geo- und Biosphäre der Erde (Falkowski *et al.*, 2008). Der biogeochemische Schwefelkreislauf ist dabei ein komplexes Netzwerk biotischer und abiotischer Reaktionen, an dem sowohl organische als auch anorganische Schwefelverbindungen beteiligt sind. Er ist mit anderen biogeochemischen Redox-Zyklen verbunden, insbesondere dem Kohlenstoff-, dem Stickstoff- und dem Metallkreislauf, und ist ein elementarer Faktor für mikrobielles Wachstum und der Energieumwandlung, gekoppelt an Redoxprozesse, in einer Vielzahl verschiedener Umgebungen (Bowles *et al.*, 2014, Wasmund *et al.*, 2017). Die Energieumwandlung durch den Schwefelkreislauf begann schon früh in der Erdgeschichte, lange bevor freier Sauerstoff in großen Mengen in der Erdatmosphäre vorhanden war (Philippot *et al.*, 2007). Heute ist Schwefel mit einer mittleren Häufigkeit von 0,05 % das am 16. häufigsten vorkommende Element in der Lithosphäre (Dopson & Johnson, 2012).

Unter normalen Umweltbedingungen besitzt Schwefel eine hohe Reaktivität, ist allotrop und weist ein breites Spektrum an Oxidationszuständen auf (-II [Sulfid] bis +VI [Sulfat]) (Suzuki, 1999, Steudel, 2000). Schwefel hat somit, neben Stickstoff (-III bis

+V), die größte Spanne stabiler Redoxstadien der Elemente, die an biogeochemischen Kreisläufen beteiligt sind. Trotz der hohen Reaktivität von Schwefelverbindungen gibt es jedoch auch stabile Zustände, wie Schwefel in seiner elementaren Form ( $S^0$ ), Schwefeldioxid ( $SO_2$ ) und insbesondere Sulfat ( $SO_4^{2-}$ ). In der Atmosphäre ist  $SO_2$  die am häufigsten vorkommende Schwefelverbindung, wohingegen in Mineralien hauptsächlich Sulfid und Sulfat vorhanden sind. Polysulfide, Polythionate, Thiosulfat, aber auch  $SO_2$  und  $S^0$  spielen in biogeochemischen Kreisläufen zwar eine kleinere, aber trotzdem signifikante Rolle.  $S^0$  dient neben Gips und Metallsulfiden als eine von drei Schwefelspeicherverbindungen, die sich in verschiedenen geologischen Perioden gebildet haben (Lens & Kuenen, 2001).

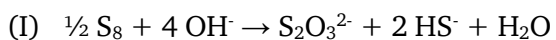
Das ursprüngliche Vorkommen von  $S^0$  sind vulkanische Habitate, wobei auch zahlreiche Hydrothermalquellen Schwefelanreicherungen aufweisen. Grund dafür ist, dass viele chemische und biologische Oxidationsreaktionen von Sulfiden unvollständig sind und  $S^0$  als Zwischenprodukt gespeichert wird. Da dessen Reaktivität unter 100 °C jedoch gering ist, akkumuliert  $S^0$  häufig in Sedimenten und geologischen Ablagerungen (Rabus *et al.*, 2013).  $S^0$  kommt zum Großteil in seiner orthorhombischen und zyklischen  $\alpha$ - $S_8$ -Form vor (Abb. 1.1). Erst bei Temperaturen über 95,6 °C kommt es zu einer chemischen Konformationsänderungen zum monoklinen  $\beta$ - $S_8$ -



**Abbildung 1.1** | Darstellung von zyklischen  $\alpha$ - $S_8$ -Schwefel (links) und Polysulfid (rechts), dessen Kettenlänge ( $n = 4$ ) variabel in Abhängigkeit des Schwefel-/Schwefelwasserstoff-Gleichgewichts ist (Klimmek *et al.*, 1991). Bei pH > 6 stellen jedoch Tetra- und Pentasulfide die dominanten Spezies dar (Giggenbach, 1972).

Schwefel, der bis zu Temperaturen von 119 °C stabil ist (Steudel, 2000). Aufgrund seiner geringen Löslichkeit in Wasser von lediglich 5 µg/l bei 25 °C (entspricht ca. 20 nM) besitzt S<sup>0</sup> eine geringe Bioverfügbarkeit (Boulegue, 1978). Die Löslichkeit erhöht sich jedoch um das 25-fache, wenn die Temperaturen 80 °C betragen (Kamyshny, 2009), was S<sup>0</sup> für (hyper-) thermophile Schwefeloxidierer leichter verfügbar macht. Mesophile Schwefel-oxidierende Mikroorganismen hingegen müssen den α-S<sub>8</sub>-Ring zunächst durch einen nukleophilen Angriff oder durch die Reduktion zu wasserlöslichen Polysulfiden aktivieren (Abb. 1.1) (Iciek & Włodek, 2001). Beide Reaktionen können von Proteinen durch Thiolgruppen aus Cystein-Resten direkt katalysiert werden. Die entstehenden hochreaktiven, linearen Sulfan-Schwefelspezies stellen dabei höchstwahrscheinlich das initiale Substrat für die meisten Enzyme dar, die S<sup>0</sup> oxidieren (Franz *et al.*, 2007, Rohwerder & Sand, 2007). Dennoch gilt die Oxidation von S<sup>0</sup> im allgemeinen Schwefelkreislauf als Flaschenhals und nur wenige Enzyme können S<sup>0</sup> direkt verwenden.

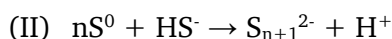
S<sup>0</sup> ist im saurem pH sowohl unter aeroben als auch unter anaeroben Bedingungen stabil. Unter neutralen und vor allem im alkalischen Milieu in Anwesenheit von Hydroxylionen disproportioniert er hingegen abiotisch zu Thiosulfat und Sulfid (Gl. I) (Roy & Trudinger, 1970, Hamilton, 1991).



Bei Raumtemperatur kommt es zu der Reaktion erst ab einem pH > 11,5. Ab 80 °C dagegen findet die Disproportionierung aufgrund der hohen chemischen Reaktivität des Schwefels bereits bei pH ≥ 7,6 statt, während im sauren Milieu Temperaturen von über 150 °C erforderlich sind (Steudel, 2000).

S<sup>0</sup> bildet stabile Polysulfidketten in Anwesenheit von Sulfid bei neutralen und alkalischen pH und unter Ausschluss von Sauerstoff (Gl. II) (Kletzin, 1989, Steudel, 2000), welche jedoch in Anwesenheit von O<sub>2</sub> oder saurem

pH wieder hydrolysiert werden (Schauder & Kröger, 1993).



Poly- bzw. Persulfide spielen in organischen Verbindungen ebenfalls eine große Rolle. Thiolgruppen, unter anderem von Cysteinen, bilden im alkalischen Milieu Persulfide (Rao & Gorin, 1959). In Peptiden wurden Persulfurierungen von Cysteinen bereits bei pH 8 gezeigt (Catsimpoolas & Wood, 1964). Auf gleiche Art und Weise können ebenfalls Sulfid-Ionen mit proteinständigen Cysteinen in Redoxreaktionen reagieren um Persulfidgruppen auszubilden. Solche Persulfide werden in einer Vielzahl von katalytischen Prozessen gebildet und spiegeln die generelle Tendenz von Schwefelatomen wider, andere Schwefelatome zu binden und somit lange Schwefelketten zu bilden – eine Eigenschaft, die sich lediglich Schwefel- und Kohlenstoffatome teilen (Steudel, 2002).

## 1.2 Schwefel-oxidierende Enzyme

Schwefel-oxidierende Enzyme sind in der Lage, S<sup>0</sup> in Anwesenheit von Sauerstoff zu Sulfit zu oxidieren. Neben dem intensiv untersuchten Schwefel Oxidationskomplex (Sox) und der oxidativen dissimilatorischen Sulfit-Reduktase (Dsr), für welche in *Allochromatium vinosum* ebenfalls anaerobe S<sup>0</sup>-Oxidation gezeigt wurde (Pott & Dahl, 1998), sind Schwefel Oxygenasen Reduktasen (SORs) und Schwefel/Persulfid Dioxygenasen (SDO/PDO) die einzigen Enzyme die S<sup>0</sup> direkt oxidieren können und als solche charakterisiert wurden. Die frühere Klassifizierung letzterer als Schwefel Dioxygenase (die teilweise auch heute noch verwendet wird) resultiert aus ursprünglichen Beobachtungen, dass Zell-extrakte vieler Schwefeloxidierer S<sup>0</sup> in Gegenwart von Glutathion (GSH) zu Sulfit oxidieren können, ermöglicht aufgrund der hohen Reaktivität von GSH mit S<sup>0</sup>. Heute weiß man jedoch, dass die Reaktion auf der Übertragung eines (oder mehrerer) Schwefelatome auf

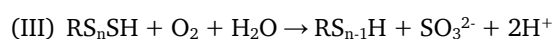
GSH beruht und das resultierende  $\text{GSS}_{(n)}\text{H}$  (Persulfid) als Substrat diene, womit die Enzyme formell als Persulfid Dioxygenasen zu bezeichnen sind.

SORs und PDOs ähneln sich darin, dass beide ein mononukleäres nicht-Häm-Eisenatom besitzen, welches in einer oktaedrischen Koordinationssphäre eingebettet ist und an dem die  $\text{S}^0$ - bzw. die Persulfid-Oxidation in den jeweiligen aktiven Zentren katalysiert wird. Die vorliegende Arbeit hatte das Ziel Enzyme beider Klassen auf molekularer und struktureller Ebene im Detail zu charakterisieren.

### 1.2.1 Persulfid Dioxygenasen

---

Persulfid Dioxygenasen (PDOs) kommen in der Natur sowohl in Eukaryoten als auch in Prokaryoten ubiquitär vor, wobei ihr Vorhandensein nicht auf Autotrophie beschränkt ist. PDOs gehören zur Superfamilie der Metallo- $\beta$ -Lactamasen (zusammen mit Glyoxalasen II) und katalysieren eine sauerstoffabhängige Oxidation des Sulfanschwefels von Glutathionpersulfid ( $\text{GSSH}$ ) und höheren Homologen ( $\text{GSS}_n\text{H}$ ) mit Sulfit und reduziertem Glutathion (GSH) als Reaktionsprodukten (Gl. III) (Kabil & Banerjee, 2012, Jung *et al.*, 2016).



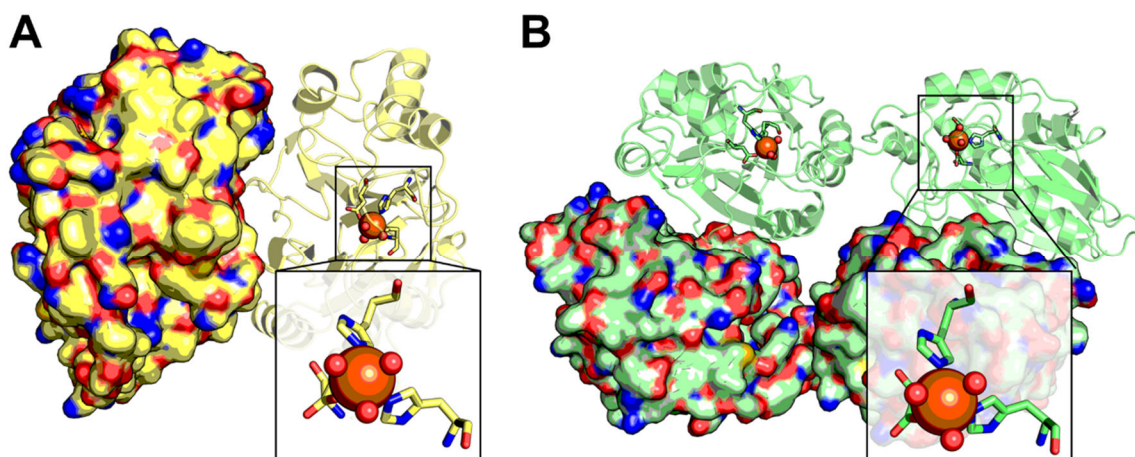
PDO- bzw. frühere SDO-Aktivitäten waren lange Zeit nur aus chemolithotrophen Schwefel-oxidierenden Bakterien der Gattungen (*Acidi-*) *Thiobacillus* bekannt. Dennoch konnte zunächst weder das entsprechende Protein erfolgreich gereinigt, noch das zugehörige Gen identifiziert werden (Suzuki & Werkman, 1959, Suzuki, 1965a, Suzuki, 1965b, Suzuki & Silver, 1966, Rohwerder & Sand, 2003). Kürzlich wurde herausgefunden, dass das humane Ethylmalonsäure-Enzephalopathie Protein 1 (hETHE1) ebenfalls PDO-Aktivität besitzt. hETHE1 nimmt, zusammen mit der Sulfid-Chinon Oxidoreduktase (SQR) und Rhodanasen, eine wichtige Rolle

bei der Entgiftung von Sulfid in der mitochondrialen Matrix ein (Hildebrandt & Grieshaber, 2008, Tiranti *et al.*, 2009, Kabil & Banerjee, 2014). Mutationen im *ethe1*-Gen sind für die erbliche, autosomal-rezessive Krankheit Ethylmalonsäure-Enzephalopathie verantwortlich (Tiranti *et al.*, 2004, Tiranti *et al.*, 2006, Tiranti *et al.*, 2009, Di Meo *et al.*, 2015). Die Krankheit zeichnet sich durch hohe Konzentrationen von Thiosulfat und C3-C5-Verbindungen, wie Ethylmalonsäure, in Urin und Körperflüssigkeiten aus und ist normalerweise innerhalb des ersten Lebensjahrs zehnte letal (Tiranti *et al.*, 2006, Tiranti *et al.*, 2009).

Angestoßen durch die Entdeckung des hETHE1 in den menschlichen Mitochondrien wurden ETHE1-homologe Proteine mit PDO-Aktivität ebenfalls unter anderem in *At. caldus* (AcPDO; zwei verschiedene), *At. ferrooxidans* und mehreren heterotrophen Bakterien identifiziert (Liu *et al.*, 2014, Wang *et al.*, 2014, Sattler *et al.*, 2015). Manche der Proteine besitzen zusätzlich eine direkte Fusion mit einer Rhodanase-Domäne (Shen *et al.*, 2015, Motl *et al.*, 2017). Die bakteriellen PDOs scheinen dabei für die PDO-Aktivitäten verantwortlich zu sein, die bereits vor rund 50 Jahren identifiziert und als SDO-Aktivitäten klassifiziert worden waren.

#### Struktureller Aufbau von PDOs

Röntgenkristallstrukturen des hETHE1 (PDB ID: 4CHL), einer ETHE1-ähnlichen PDO aus *Arabidopsis thaliana* (2CGU) und verschiedener bakterieller PDOs zeigen homodimere oder homotetramere Proteine mit molekularen Massen von 25-30 kDa, bzw. 40-45 kDa (jeweils pro Enzymuntereinheit) für Proteine mit einer Rhodanase-Fusion (Abb. 1.2) (McCoy *et al.*, 2006b, Pettinati *et al.*, 2015, Sattler *et al.*, 2015, Motl *et al.*, 2017). Die Struktur des hETHE1 zeigt eine für  $\alpha\beta\alpha$  Metallo- $\beta$ -Lactamasen typische Anordnung mit zwei zentralen  $\beta$ -Faltblättern, welche von drei  $\alpha$ -Helices auf jeder Seite umgeben werden (Pettinati *et al.*, 2015).



**Abbildung 1.2** | Röntgenkristallstrukturen des hETHE1 (PDB: 4CHL) und der PDO aus *Arabidopsis thaliana* (ArPDO; 2GCU). **A**, Homodimeres hETHE1 mit vergrößerter Darstellung des katalytischen Zentrums. **B**, Homotetramere ArPDO mit vergrößerter Darstellung des katalytischen Zentrums.

Das aktive Zentrum bildet ein mononukleäres, nicht-Häm Eisenatom, das von zwei Histidinen, einem Aspartat und drei Wassermolekülen koordiniert wird. Diese oktaedrische Koordinationsgeometrie ähnelt der 2-His-1-Carboxylat Triade, wie sie in vielen Oxygenasen zu finden ist (Kal & Que, 2017). Das Redoxpotential wurde für hETHE1 mittels EPR-gekoppelten Redox-Titrations bestimmt und beträgt -272 mV (Henriques *et al.*, 2014). Es ist damit vergleichsweise negativ und liegt rund 300 mV unter dem von vielen anderen nicht-Häm Eisenoxygenasen. Eine ähnliche Beobachtung wurde bereits für die SOR aus *Acidianus ambivalens* gemacht, die eine ähnliche Konstitution des Eisensentrums besitzt (Kletzin, 2008).

Die Bindungstasche des aktiven Zentrums umfasst hauptsächlich Aminosäurereste, die für die Bindung und Positionierung des Substrats verantwortlich zu sein scheinen. Dabei ersetzt das Substrat vermutlich ein oder mehrere Wassermoleküle der Koordinationsphäre, wie es in den Röntgenkristallstrukturen der PDOs aus *Pseudomonas putida* (PDB: 4YSL) und *Paraburkholderia phytofirmans* (PpPDO; 5VE5) anhand von GSH-Bindungen an das aktive Zentrum gezeigt wurde (Sattler *et al.*, 2015, Motl *et al.*, 2017).

Manche Cystein-Reste scheinen in PDOs essentiell für die Katalyse zu sein. Mutationsanalysen des hETHE1 haben gezeigt, dass eine Serin-Substitution des sich an der Proteinoberfläche befindenden C<sub>247</sub> einen starken Abfall der Enzymaktivität verursachte (Jung *et al.*, 2016). In der hETHE1-Röntgenkristallstruktur und auch in der aus *Arabidopsis thaliana* liegt dieses Cystein doppelt oxidiert als Cysteinyl-Sulfinsäure (Cys-SO<sub>2</sub><sup>-</sup>) vor, wobei vermutet wurde, dass es sich dabei um ein Artefakt aus der Proteinpräparation handeln könnte (McCoy *et al.*, 2006b, Pettinati *et al.*, 2015). Im Gegensatz dazu zeigen Röntgenkristallstrukturen bakterieller PDOs keine Modifikationen dieses konservierten Cysteins (Sattler *et al.*, 2015, Motl *et al.*, 2017). Nachfolgende biochemische Analysen legten jedoch nahe, dass C<sub>247</sub> Polysulfid-modifiziert ist und für die Polysulfidierung weiterer Cystein-Reste verantwortlich zu sein scheint (Jung *et al.*, 2016). Inhibitionsstudien einer der beiden AcPDOs (Uniprot ID: A0A2P9DTT9), welche auch im Fokus dieser Arbeit steht (s. Kap. 3), mit Thiol-bindenden Agenzien deuteten darüber hinaus ebenfalls auf die Bedeutung von Cystein-Resten für die PDO-Katalyse hin (Wang *et al.*, 2014).

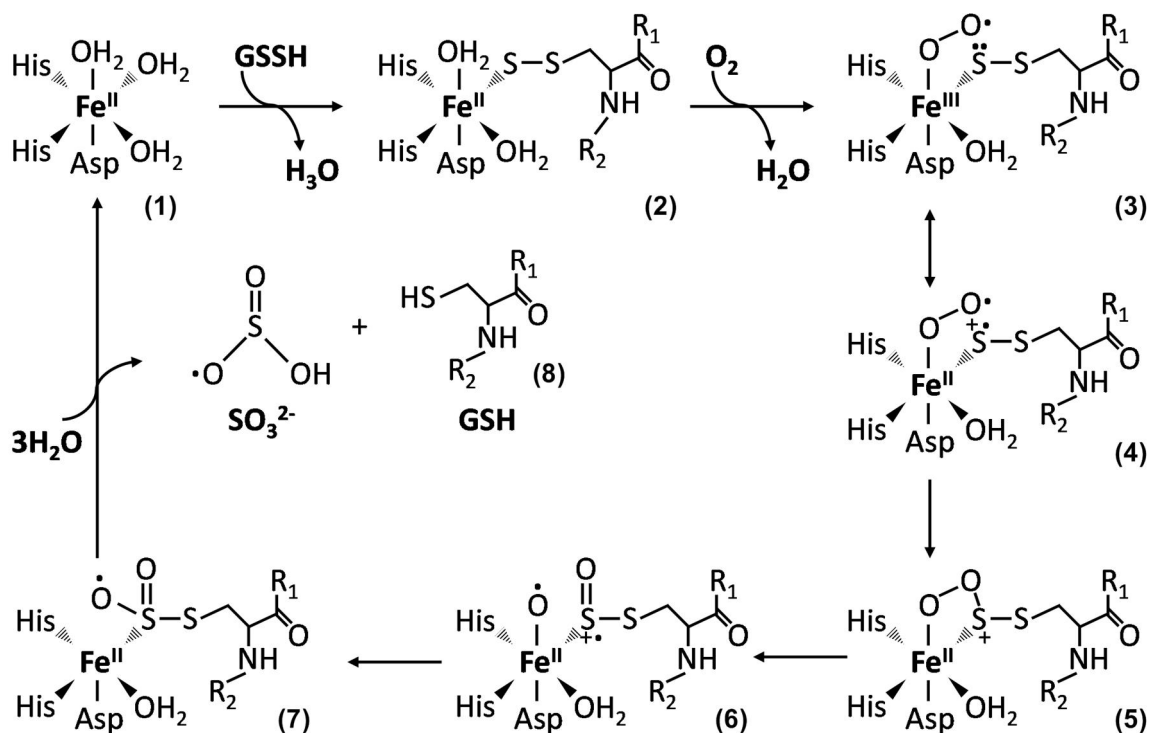
### Reaktionsmechanismus von PDOs

Während die Reaktionsmechanismen vieler mononuklearer nicht-Häm-Eisen-Dioxygenasen bereits im Detail untersucht worden sind (Costas *et al.*, 2004, Bruijninx *et al.*, 2008), sind die von PDOs noch weitgehend ungeklärt. Basierend auf dem allgemeinen Mechanismus solcher nicht-Häm-Eisen Dioxygenasen, insbesondere der strukturverwandten Cystein Dioxygenasen (McCoy *et al.*, 2006a), wurde für PDOs ein allgemein gültiger Reaktionsmechanismus vorgeschlagen (Abb. 1.3) (Kabil & Banerjee, 2012, Lin *et al.*, 2016, Kabil *et al.*, 2018).

Hierbei ersetzt GSSH ein Wassermolekül der Eisenkoordinationssphäre und bindet an  $\text{Fe}^{2+}$  (1). Anschließend wird ein zweites Wassermolekül durch  $\text{O}_2$  ersetzt (2), sodass sich ein Fe-Superoxo-Komplex bildet (3). Dieser verleiht dem Fe-gebundenen Sulfanschwefel des Substrats einen Kationencharakter (4), wobei im nächsten Schritt durch die Rekombination des Superoxo- und Schwefelradikals ein zyklisches Peroxid-Intermediat entsteht

(5). Es folgt eine homolytische Spaltung der O-O-Bindung, sodass ein Sulfoxyl-Zwischenzustand und ein  $\text{Fe}^{2+}$ -gebundener aktivierter Sauerstoff zurückbleibt (6). Eine Umlagerung des aktivierten Sauerstoffs auf das Sulfoxyl-Kation resultiert in einem  $\text{GSSO}_2^-$ -Intermediat (7). Die hydrolytische Spaltung von  $\text{GSSO}_2^-$  führt zu der Endproduktbildung von GSH und Sulfit (8). Die gebildeten Zwischenprodukte bilden sich nur temporär und sind hoch reaktiv, weshalb bislang keines direkt charakterisiert wurde. Der bislang postulierte PDO-Reaktionsmechanismus fokussiert sich jedoch ausschließlich auf die Reaktion am katalytischen Eisenzentrum und lässt mögliche Beteiligungen angrenzender Aminosäure-Seitenketten außer Acht. Dementsprechend hatte die vorliegende Arbeit zum Ziel, für die Katalyse essentielle Aminosäuren zu identifizieren und deren Funktion in den Mechanismus einzubetten.

Kabil *et al.* (2018) nutzten darüber hinaus  $\gamma$ -Glutamyl-Homocysteinyl-Glycin (GHcySH) als PDO Substrat-Analogen und Mechanis-



**Abbildung 1.3** | Hypothetischer PDO-Reaktionsmechanismus am katalytischen Eisenzentrum nach Kabil *et al.* (2018).  $R_1$  und  $R_2$  des GSSH-Substrates entsprechen jeweils dem Glutamat- bzw. Glycin-Anteil.

mus-basierten Inhibitor, um den finalen Hydrolyse-Schritt im katalytischen Zyklus der PDO-Reaktion zu unterbinden. Hierbei wurde das Cystein des GSHs (natürlicherweise ein Tripeptid aus  $\gamma$ -Glu-Cys-Gly) durch Homocystein substituiert. hETHE1 konnte GHcySH als alternatives Substrat nutzen und es zu GHcy-SO<sub>2</sub>H umwandeln, welches dem natürlichen Reaktionsintermediat GS-SO<sub>2</sub>H ähnelt. Aufgrund der distalen C-S-Bindung (ähnlich wie im Reaktionsprodukt GSH) anstelle der herkömmlichen S-S-Bindung war jedoch der finale Hydrolyse-Schritt nicht möglich, was zu einer Inhibition der PDO führte. Auf diese Weise konnte mit dem nachgeahmten Reaktionsintermediat zumindest ein Zwischenschritt der Katalyse biochemisch/massenspektrometrisch sichtbar gemacht werden.

Nichtsdestotrotz berücksichtigen alle bisher veröffentlichten PDO-Studien keine mögliche Beteiligung von (essentiellen) Cystein-Resten und von Substrat-bindenden Aminosäuren in der Bindungstasche des aktiven Zentrums, sodass deren Rolle in der Katalyse unklar bleibt.

### 1.2.2 Schwefel Oxygenase Reduktasen

Schwefel Oxygenasen Reduktasen (SORs) katalysieren eine sauerstoffabhängige Disproportionierungsreaktion von S<sup>0</sup> mit Sulfit, Thiosulfat und Sulfid als detektierbare Reaktionsprodukte (Kletzin, 1989, Urich *et al.*, 2004, Veith *et al.*, 2012). Thiosulfat stellt möglicherweise kein primäres Produkt der enzymatischen Reaktion dar, sondern wird in einer nicht-enzymatischen, schnellen Reaktion zwischen elementarem Schwefel und Sulfit bei pH Werten über 6 und Temperaturen über 50 °C gebildet (Roy & Trudinger, 1970, Kletzin, 1989, Pöll, 2016, Rühl *et al.*, 2017). Für die Katalyse der Reaktion werden keine externen Co-Faktoren oder Elektronendonoren benötigt, sie leistet jedoch auch keinen Beitrag zum elektrochemischen Gradienten entlang der Cytoplasmamembran (Kletzin, 1989, Kletzin, 2008). Vielmehr wird ange-

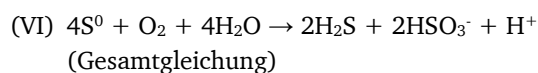
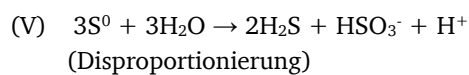
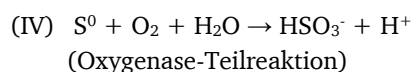
nommen, dass sie den schwer löslichen elementaren Schwefel in lösliche Substrate umwandelt, welche anschließend von membranständigen Oxidoreduktasen weiter prozessiert werden, die direkt an die Atmungskette gekoppelt sind (s. Kap. 1.4, Schwefeloxidation in *Acidianus ambivalens*, für weitere Details).

Polysulfide werden als alternative Substrate für die SOR-Reaktion angenommen, einerseits wegen der geringen Löslichkeit von S<sup>0</sup> und andererseits aufgrund der Tatsache, dass viele Zugangskanäle zum aktiven Zentrum zu eng für eine Passage des vergleichsweise voluminösen, zyklischen Octasulfanschwefels sind. Dies ist jedoch sehr spekulativ und es gibt nur wenige Hinweise, die auf Polysulfide als Substrat hindeuten (Pelletier *et al.*, 2008, Veith, 2011). Vielmehr wurden fast alle biochemischen Daten bislang mit Octasulfanschwefel als Substrat erhoben.

In Archaea ist die SOR bislang das einzig bekannte Enzym, welches S<sup>0</sup> oxidieren kann. Für *Ac. ambivalens* wurde darüber hinaus gezeigt, dass dessen SOR (AaSOR) das initiale Enzym im dissimilatorischen Schwefeloxidationsweg ist (Kletzin *et al.*, 2004). Die AaSOR stellt den am besten untersuchten SOR-Vertreter dar, wobei an ihr der erste Nachweis der gekoppelten Produktion von Sulfit, Thiosulfat und Sulfid erfolgte (Kletzin, 1989). Zuvor wurde bereits für die SOR aus *Ac. brierleyi* ein moderater Einbau von <sup>18</sup>O in Sulfit gezeigt und die SOR aus dem Organismus als Schwefel Oxygenase klassifiziert (Emmel *et al.*, 1986). Somit ist es wahrscheinlich, dass es sich bei SORs eher um Monooxygenasen und nicht um Dioxygenasen handelt (Kletzin, 2008).

Normalerweise besitzen SORs eine Produktstöchiometrie zwischen 4:1 und 10:1 zwischen oxidierten und reduzierten Produkten in Enzymtests mit kolorimetrischen Nachweisreaktionen. Oxygenase- (die Summe aus Sulfit plus Thiosulfat) und Reduktase- (Sulfid) Aktivitäten konnten für SORs lange Zeit nicht voneinander getrennt werden, auch nicht durch eine Vielzahl von Mutagenesestu-

dien, wobei die Stöchiometrie der Enzymvarianten in einigen Fällen variierte (Veith *et al.*, 2011). Das breite Spektrum der Produktstöchiometrie wurde als Ergebnis der vermeintlich hohen Flüchtigkeit von  $\text{H}_2\text{S}$  unter den Reaktionsbedingungen interpretiert, tatsächlich liegt die Löslichkeit (bezogen auf die Henry Konstante) von  $\text{H}_2\text{S}$  jedoch bei ca. 0,1 M bei 25 °C und damit beim ca. Dreifachen von  $\text{CO}_2$  und dem 80-fachen von  $\text{O}_2$ . Enzymtests in Anwesenheit von Zinkacetat, welches gebildetes Sulfid fixiert (Budd & Bewick, 1952), hatte eine Produktstöchiometrie von nahezu 1:1 zur Folge, wobei Zink ebenfalls als Inhibitor der SOR identifiziert wurde (Kletzin, 1989). Basierend auf dieser Kalkulation wurden folgende SOR-Reaktionsgleichungen aufgestellt (Gl. IV-VI):



SORs wurden ursprünglich in thermoacidophilen, Schwefel-oxidierenden Archaea gefunden, die idealerweise bei Temperaturen zwischen 70 und 80°C und pH 1 bis 4 wachsen (Tab. 1.1). Später wurden *sor* Gene ebenfalls in Genomen von thermophilen und mesophilen Bacteria identifiziert, wie beispielsweise in *Aquifex aeolicus*, *Sulfobacillus* spp. und *Acidithiobacillus* spp. Manche der Gene wurden in *E. coli* exprimiert, wobei biochemische Untersuchungen vergleichbare Eigenschaften der bakteriellen SORs und den archaealen Homologen ergaben. Gleiches gilt für die ebenfalls biochemisch charakterisierte SOR aus dem mesophilen Gammaproteobakterium *Halotheiobacillus neapolitanus* (HnSOR) (Veith *et al.*, 2012, Pöll, 2016), welcher optimale Wachstumstemperaturen von ca. 30 °C (maximal 43 °C) besitzt (Wood *et al.*, 2005). Die

SORs aller dieser Organismen haben Temperaturoptima zwischen 65 und 85°C und pH-Optima zwischen 5 und 8,4 (Tab. 1.1).

Kürzlich wurden weitere *sor* Gene im Genom von drei haloalkaliphilen *Thioalkalivibrio* spp. gefunden, welche aus Sodaseen isoliert worden waren (Sorokin *et al.*, 2002, Sorokin *et al.*, 2003). Unter ihnen zweigen zwei sequenzähnliche SORs aus *Tv. paradoxus* und *Tv. nitratreducens* tief im phylogenetischen Dendrogramm der SOR-Proteinfamilie ab (Abb. 1.4; Sequenzidentität zu allen anderen SORs 29 bis 34 %). Erste biochemische Untersuchungen der SOR aus dem mesoalkaliphilen *Tv. paradoxus* (TpSOR) hatten größtenteils SOR-typische biochemische Eigenschaften gezeigt (Rühl *et al.*, 2017). Thiosulfatbildung wurde in einer Temperaturspanne zwischen 10 und 98 °C mit einem Temperaturoptimum von ebenfalls 80 °C bei pH 9 beobachtet (s. Kapitel 4 für Details). Sulfidbildung wurde dagegen lediglich in sehr geringen Mengen nachgewiesen. Die spezifische Reduktase-Aktivität betrug < 1%, verglichen zu allen anderen bereits charakterisierten SORs. Dies lässt erste Vermutungen zu, dass die Reduktase-Aktivität kein integraler Bestandteil des SOR-Reaktionsmechanismus zu sein scheint.

### Struktureller Aufbau von SORs

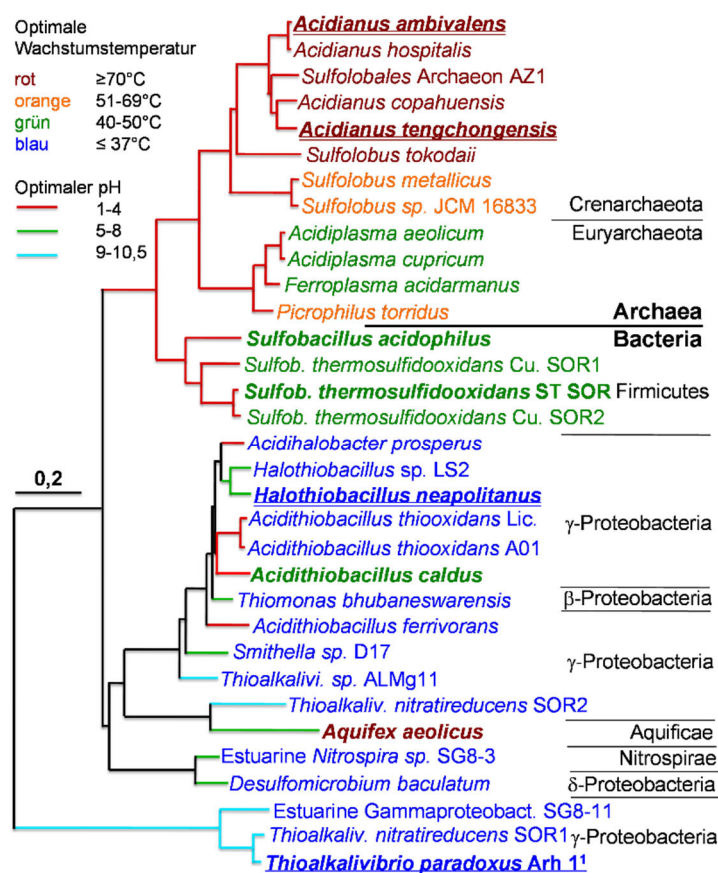
Die strukturelle Basis für die biologisch aktive Einheit von SORs bilden Monomere mit einer molekularen Masse von 35 kDa (Abb. 1.5 A). Die Proteinuntereinheiten besitzen ein zentrales  $\beta$ -barrel, welches von  $\alpha$ -Helices umgeben ist. Reversible Denaturierungsstudien zeigten, dass Homodimere die Ausgangsbasis für die Assemblierung des SOR Holoenzym darstellen (Urich *et al.*, 2004). Zwölf solcher Homodimere (24 Monomere) lagern sich zusammen und bilden ein kugelförmiges Holoenzym mit einer nicht-kristallographischen 432-Punktsymmetrie und einer hohlen inneren Kavität (Abb. 1.5 BC) (Urich *et al.*, 2004, Urich *et al.*, 2006).

**Tabelle 1.1** | Eigenschaften von Mikroorganismen und derer Schwefel Oxygenasen Reduktasen.

Parameter	Herkunft	Bacteria <sup>1</sup>			Archaea <sup>2</sup>		
		<i>Tv. paradoxus</i>	<i>H. neapolitanus</i>	<i>Aq. aeolicus</i>	<i>Ac. ambivalens</i>	<i>Ac. brierleyi</i>	<i>Ac. tengchongensis</i>
T <sub>Opt</sub> (°C)	Organismus	35-37	30	85	80	65-70	70
	Enzym	80	80	80	85	65	70
Spez. Akt (U mg <sup>-1</sup> ) bei T <sub>Opt</sub>	Oxygenase	308 ± 78	42,1	78,8	10,6 / 66,9 <sup>a</sup>	0,9	186,7
	Reduktase	≤ 0,03	4,1	3,05	2,6 / 18,7 <sup>a</sup>	nb <sup>3</sup>	45,2
Temperaturbereich (°C)	Enzym	10-98	10-99	20-90	10-108	55-≥80	50-90
pH <sub>Opt</sub>	Organismus	10	6,5-6,9	6,8	2,5	1,5-2,0	2,5
	Enzym	9	8,4	nb <sup>3</sup>	6,5-7,4	7,0	5
pH Bereich	Enzym	6-11,5	5,4-11	5,5-8	5-8,4	nb <sup>3</sup>	3,5-9
M <sub>r</sub>	Untereinheit	35 187	35 300	37 674	35 318	35 000 <sup>4</sup>	35 172
	Holoenzym (Methode) <sup>5</sup>	556 000 (GPC)	848 000 (DLS)	602 000 (NG)	844 000 (X); 497 000- 550 000 (GPC)	560 000 (NG)	845 000 (X)
Referenz(en)		(Rühl <i>et al.</i> , 2017)	(Veith, 2011) (Veith <i>et al.</i> , 2012)	(Pelletier <i>et al.</i> , 2008)	(Kletzin, 1989) (Urich <i>et al.</i> , 2004) (Urich <i>et al.</i> , 2006) (Pöll, 2016) (Rühl <i>et al.</i> , 2017)	(Emmel <i>et al.</i> , 1986)	(Sun <i>et al.</i> , 2003) (Chen <i>et al.</i> , 2005) (Li <i>et al.</i> , 2008)

<sup>1</sup> Proteine alle rekombinant hergestellt.<sup>2</sup> *Ac. ambivalens*, nativ/rekombinant; *Ac. brierleyi*, nativ; *Ac. tengchongensis*, rekombinant. <sup>a</sup>, erster Wert, nativ; zweiter Wert, rekombinant.<sup>3</sup> nb, nicht bestimmt/nicht beschrieben.<sup>4</sup> Apparentes Molekulargewicht in SDS-Gelen; das *sor* Gen ist für dieses Isolat nicht bekannt.<sup>5</sup> GPC, Gelpermeationschromatographie; DLS, Differential-Lichtstreuung; NG, native Gelelektrophorese; X, Röntgenkristallographie. GPC-Analysen der AaSOR im Bereich 497 000 - 550 000, der erste Wert bezieht sich auf Untersuchungen des rekombinanten Proteins, der zweite für das native Protein.

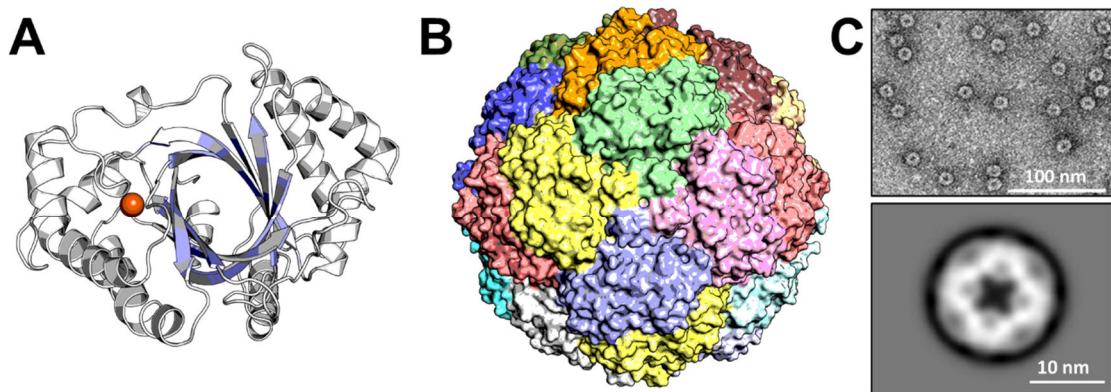




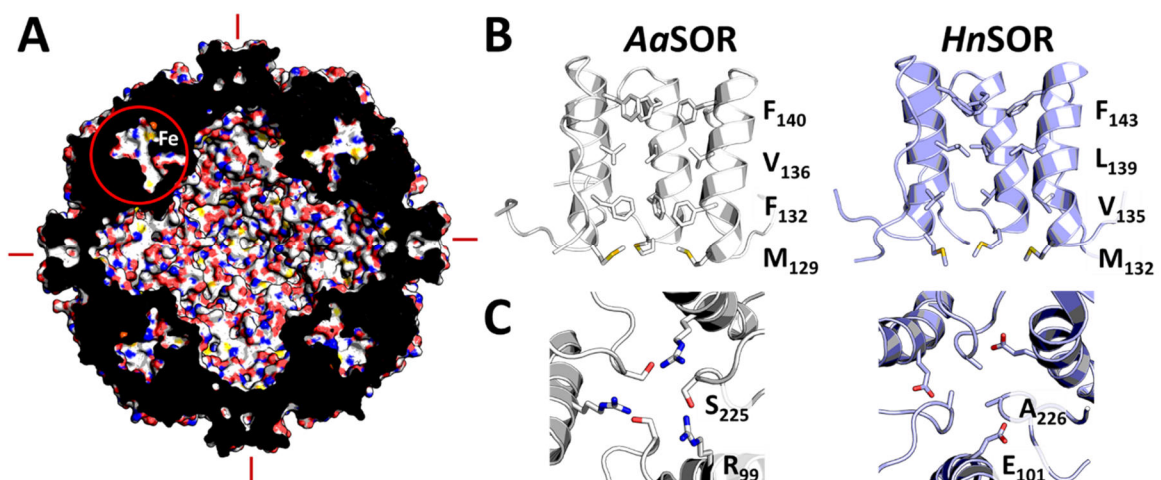
**Abbildung 1.4** | Farbkodierter phylogenetischer Stammbaum von SOR-Sequenzen. Fettschrift, gereinigtes Enzym und/oder Genexpression in *E. coli* in der Literatur beschrieben; Doppelt unterstrichen, Röntgenkristallstruktur bekannt. <sup>1</sup> Teile der biochemischen Charakterisierung (Rühl *et al.*, 2017) und die Röntgenkristallstruktur sind Teile dieser Arbeit.

Die AaSOR ist die am besten untersuchte SOR und für sie wurde zum ersten Mal eine hochauflösende Röntgenkristallstruktur eines Vertreters dieser Enzymklasse ermittelt (Urich *et al.*, 2005a, Urich *et al.*, 2006). Das AaSOR Holoenzym ist ein Icosatetramer und besitzt eine molekulare Masse von 840 kDa bei einem Durchmesser von 15 nm. Das aktive Zentrum der SOR wird von einem Eisenatom gebildet, welches tief im Enzyminneren verborgen ist. Das Substrat muss vermutlich zunächst schornsteinähnliche Strukturen an der Vierfachsymmetrieachse des Enzyms passieren, den so genannten Tetramerkanal (Abb. 1.6). Von dort gelangt es in den geräumigen inneren Hohlraum. Die innere Oberfläche des Tetramerkansals ist stark hydrophob und wird

von zwei Phenylalaninen (F<sub>132</sub> und F<sub>141</sub>), einem Valin (V<sub>137</sub>) und einem Methionin (M<sub>130</sub>) an der Basis des Kanals gebildet. Die C-C-Abstände sind mit 3,2 Å an der engsten Stelle zu klein für die Passage von Octasulfanschwefel und legen demnach nahe, dass Polysulfide das eigentliche Substrat darstellen (Urich *et al.*, 2006, Veith, 2011). Es ist jedoch unklar, inwiefern sich die hohen Reaktionstemperaturen auf die atomare Beweglichkeit in dem Kanal auswirken. Die 3D-Struktur der HnSOR zeigt einen grundlegend ähnlichen Aufbau des Tetramerkansals, verglichen mit der AaSOR. Erste Tunnelanalysen legten jedoch nahe, dass der Durchmesser des äußeren Phenylalaninringes (F<sub>143</sub>) zu klein für die Passage von Schwefelspezies zu sein scheint, auch in



**Abbildung 1.5** | 3D-Struktur-Darstellung von AaSOR-Monomer und -Holoenzym und elektronenmikroskopische Aufnahmen. **A**, AaSOR-Monomer mit zentraler  $\beta$ -barrel-Struktur und katalytischem Eisenatom (Kugel). **B**, AaSOR-Holoenzym mit kolorierten Enzymuntereinheiten und Aufsicht auf die kristallographische Vierfachsymmetrieachse (Urich *et al.*, 2006). **C**, Elektronenmikroskopische Aufnahmen der AaSOR mit Negativkontrastierung (oben) und Einzelpartikeldarstellung (*single-particle averaging*; unten) (Urich *et al.*, 2004).



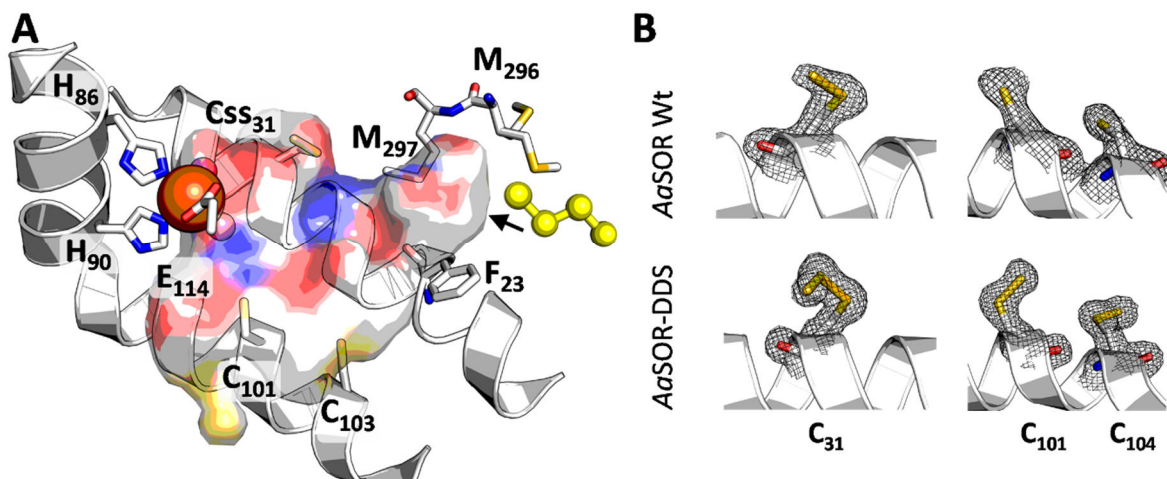
**Abbildung 1.6** | 3D-Struktur des inneren Hohlraums des AaSOR-Holoenzym mit Tetramer- und Trimerkanälen von AaSOR und HnSOR. **A**, Querschnitt durch das AaSOR-Holoenzym mit innerem Hohlraum. Rote Striche, Vierfachsymmetrieachse/Tetramerkanal; Roter Kreis, aktives Zentrum. **B**, Tetramer- und **C**, Trimerkanäle der AaSOR und HnSOR mit strukturell beteiligten Aminosäureresten.

ihrer linearen Form (Pöll, 2016). AaSOR-Varianten mit einem verkürzten oder vollständig deletierten Tetramerkanal zeigten deutlich erhöhte Enzymaktivitäten, weshalb der Tetramerkanal für die Erhöhung der Selektivität der Substrataufnahme verantwortlich zu sein scheint (Veith *et al.*, 2011).

Von der inneren Kavität ausgehend bilden die hydrophoben Aminosäuren F<sub>23</sub>, M<sub>296</sub> und M<sub>297</sub> die Zugangspore zum aktiven Zentrum, welches in einer geräumigen Substratbindeta-

sche liegt (18 x 18 x 6 Å; Abb. 1.7). Jedes der 24 aktiven Zentren ist mit einem minimalen Eisenabstand von 38 Å räumlich klar voneinander separiert, sodass eine direkte Interaktion untereinander unwahrscheinlich ist (Kletzin, 2008).

Das katalytische, farblose nicht-Häm Eisenatom wird von zwei Histidinen, einem zweizähligen Glutamat und zwei Wassermolekülen ligiert (Abb. 1.7 A) (Urich, 2005). Die resultierende oktaedrische Koordinationssphäre



**Abbildung 1.7** | Aktives Zentrum der AaSOR und Cysteinmodifikationen. **A**, Strukturelle Darstellung der AaSOR-Bindungstasche mit katalytischem Eisenatom (orangene Kugel) und Eisenliganden, konservierten Cystein-Resten und Aminosäuren, die an der Porenbildung zur Bindungstasche beteiligt sind. Der Pfeil zeigt den Bereich des Eingangs zum aktiven Zentrum. Exemplarisches Polysulfid ( $n = 4$ ) ist als gelbe Kugeln dargestellt. **B**, Darstellung der Elektronendichte der AaSOR-Röntgenkristallstruktur im Wildtyp-Enzym (AaSOR Wt) und nach Inkubation mit dem organischen Inhibitor Dimethyl Disulfid (AaSOR-DDS).

ist durch den zweizähligen Glutamat-Liganden eine Variation der 2-His-1-Carboxylat-Triade, die typisch für über 100 verschiedene Oxygenasen ist, inklusive der PDOs (Kal & Que, 2017). Die Eisenliganden sind essentiell für die Enzymaktivität (Urich *et al.*, 2005b). EPR-Studien der AaSOR zeigten, dass es sich bei dem Eisenzentrum um ein *high-spin* Eisenatom mit dem Ladungszustand  $+III$  handelt, welches nach Inkubation bei hohen Temperaturen mit Schwefel reduziert wird (Urich, 2005). Das Redoxpotential ( $E_0' = -268$  mV) ist, analog zu Beobachtungen an PDOs, ungewöhnlich niedrig und liegt ebenfalls rund 300 mV unter dem vieler anderer nicht-Häm Eisenatome (Kletzin, 2008), es reicht jedoch aus um die Reduktion von  $S^0$  zu Sulfid zu erklären ( $E_0' = -270$  mV für  $H_2S/S^0$ ; Thauer *et al.* (1977)), vorausgesetzt, dass die Schwefelreduktion bzw. -Disproportionierung (Gl. V, S.10) durch einen Wechsel des Redoxzustands des Eisens erfolgt.

Die Substratbindungstasche wird hauptsächlich von zwei  $\alpha$ -Helices gebildet in denen sich drei konservierte Cysteine befinden, deren Reste in die Bindungstasche hineinragen

(Abb. 1.7 A). In der Röntgenkristallstruktur der AaSOR ist C<sub>31</sub> persulfuriert (Urich *et al.*, 2006). Hierbei handelt es sich womöglich um eine enzymatische Auto-Sulfurierung nach einem Hitzefällungsschritt in *E. coli*. In weiteren Röntgenkristallstrukturen der AaSOR ohne Hitzefällung und auch in der 3D-Struktur der SOR aus *Acidianus tengchongensis* (AtSOR) ist eine solche Cysteinmodifikation nicht vorhanden (Li *et al.*, 2008, Veith, 2011, Pöll, 2016). Mutagenesestudien von AaSOR und AtSOR zeigten jedoch, dass C<sub>31</sub> essentiell für die Katalyse ist (Chen *et al.*, 2005, Urich *et al.*, 2005b). Die beiden Cysteine C<sub>101</sub> und C<sub>104</sub> befinden sich in einer gegenüberliegenden Helix in einem SOR-typischen CXXC-Motiv. Sie weisen in den Röntgenkristallstrukturen der archaealen SORs keine Modifikationen auf. C<sub>10X</sub>A/S-Varianten resultierten in einer deutlichen Verringerung der Enzymaktivität, sie scheinen jedoch nicht essentiell für die Katalyse zu sein (Chen *et al.*, 2005, Urich *et al.*, 2005b). Entgegen den Beobachtungen im Wildtyp-Enzym waren in der AaSOR nach Inkubation des Enzyms mit organischen Di- und Trisulfiden, welche zuvor als Inhibitoren iden-

tifiziert worden waren, ebenfalls Persulfurierungen an den beiden benachbarten und konservierten C<sub>101/104</sub> und Trisulfurierungen an C<sub>31</sub> in Röntgenkristallstrukturen sichtbar (Abb. 1.7 B) (Pöll, 2016).

In der Röntgenkristallstruktur der nativen HnSOR kommt C<sub>33</sub> (Homolog zu C<sub>31</sub> in der AaSOR) ebenfalls als Persulfid vor, auch ohne Hitzeaktivierung, wobei C<sub>103</sub> und C<sub>106</sub> (AaSOR: C<sub>101</sub>/C<sub>104</sub>) ebenfalls Schwefelmodifikationen aufwiesen (Pöll, 2016). Es wird daher angenommen, dass C<sub>31</sub> (und dessen Homologe) höchstwahrscheinlich die Substratbindestelle darstellt, während die beiden Cysteine C<sub>101/104</sub> an der Substratorientierung beteiligt sein könnten (Urich, 2005, Urich *et al.*, 2006).

Die Reaktionsprodukte gelangen anschließend aus dem aktiven Zentrum wieder in den inneren Hohlraum, wobei unklar ist ob Substrateingang in die *active site pocket* und Produktausgang in den inneren Hohlraum identisch sind. Der Produktausgang aus dem Holoenzym wird von einer polaren Pore von den Aminosäuren R<sub>99</sub> und S<sub>221</sub> an der Dreifachsymmetrieachse der AaSOR gebildet, dem Trimerkanal (Li *et al.*, 2008, Veith, 2011). Für die HnSOR wurden die homologen Aminosäuren A<sub>226</sub> und E<sub>101</sub> als porenbildend identifiziert (Abb. 1.6 C) In der *Acidianus tengchongensis* SOR wurde ausgehend vom aktiven Zentrum ein zweiter Kanal identifiziert, der das aktive Zentrum direkt mit dem Trimerkanal verbindet und womöglich den direkten Produktausgang nach der Katalyse ermöglicht (Li *et al.*, 2008). Dieser Kanal ist auch in der AaSOR vorhanden, jedoch bewirkt die Untereinheitenassemblierung im Holoenzym ein Schließen der Pore. Die gleiche Beobachtung wurde in nachfolgenden Analysen des AtSOR-Holoenzym getroffen, weshalb erste Vermutungen eines direkten Produktausgangs aus der *active site pocket* als unwahrscheinlich angesehen werden können (Pöll, 2016). Analysen der HnSOR legten jedoch für das Holoenzym eine Öffnung des homologen Kanals nahe, der auch nach Assemblierung der Untereinheiten

Bestand hat (Veith *et al.*, 2011, Pöll, 2016). Insgesamt scheint die HnSOR, verglichen mit der AaSOR, ein erweitertes Tunnelnetzwerk zu besitzen, wobei verschiedene Tunnel die Bindungstasche mit der inneren Kavität bzw. der äußeren Proteinoberfläche verbinden. Es ist jedoch unklar inwiefern das ausgedehnte Netzwerk essentiell für den Transport von Substrat und Reaktionsprodukten ist (s. Kap. 6 für Details).

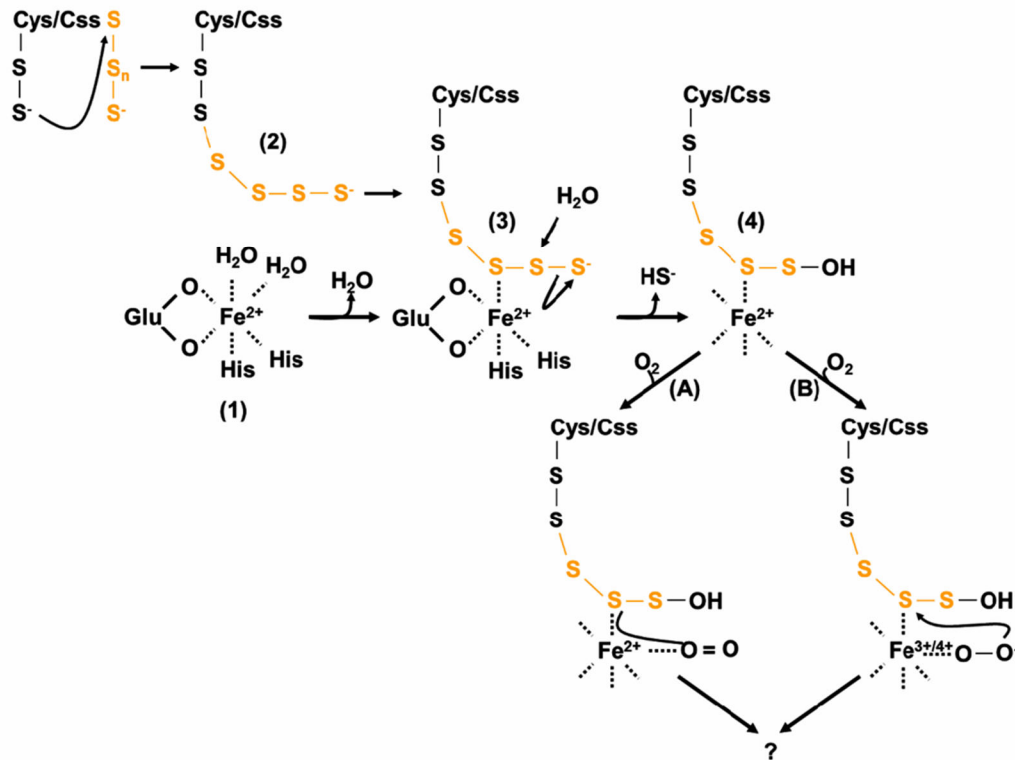
### SOR-Reaktionsmechanismus

Die SOR-Reaktion besteht aus zwei Teilreaktionen, einer Oxygenase- und einer Disproportionierungsreaktion (Gl. IV und V; Abb. 1.8).

Für die Oxygenase-Reaktion muss das katalytische Eisenatom im Fe<sup>2+</sup>-Zustand vorliegen um Sauerstoff binden zu können, da Fe<sup>3+</sup> keinen Sauerstoff aktivieren kann (Costas *et al.*, 2004). Für die Reduktion des Eisenzentrums kommt es womöglich zu einer Veränderung der oktaedrischen Koordinationssphäre, wobei ein Eisenligand seine Bindungsstelle verlassen muss, um diese auf fünf zu reduzieren, allerdings wurde dies bislang nicht beobachtet. Die Sauerstoffbindung resultiert in einem kurzlebigen Fe(IV)-Superoxo-Intermediat um das Substrat zu attackieren. Wahrscheinlich kommt es anschließend zu einem Elektronentransfer von der Schwefelkette auf Fe(IV), um den Elektronenpool wieder aufzufüllen.

Im Gegensatz dazu benötigt die Disproportionierungsreaktion ein starkes Nukleophil (z.B. OH<sup>-</sup>) und ist nicht auf die Anwesenheit von O<sub>2</sub> angewiesen, wobei eines der Eisenkoordinierenden Wassermoleküle hierfür in Frage kommt. Das in einigen SOR-Strukturen persulfurierte C<sub>31</sub> deutet auf eine kovalente Bindung eines Schwefelatoms des Substrats hin. Polysulfid würde in diesem Modell als Polysulfankette an C<sub>31</sub> binden und in diesem Zustand an dem Eisenzentrum ausgerichtet, wobei es ein Wassermolekül ersetzt, gefolgt von einer hydrolytischen Spaltung der terminalen Thiolgruppe (R-SH) zu Sulfid durch eine Eisen-katalysierte Lewis-Säure-Reaktion, in des-





**Abbildung 1.8** | Hypothetischer Reaktionsmechanismus der SOR-Reaktion mit zwei denkbaren Wegen der Sauerstoffaktivierung (Veith, 2011). Gelb, Polysulfidkette (n= 4) als Substrat.

sen Folge ein Polysulfan mit einer endständigen Sulfensäuregruppe (R-S-O<sup>-</sup>) zurückbliebe. Durch die Sulfensäure oder durch Fe<sup>2+</sup> aktivierter Sauerstoff kann anschließend die Sulfensäuregruppe zu Polysulfinsäure oxidieren (R-S-O<sub>2</sub><sup>-</sup>), welche oxidativ zu Sulfit (HSO<sub>3</sub><sup>-</sup>) und einer verkürzten Polysulfensäure-Kette (R-S<sub>n-2</sub>-S-O<sup>-</sup>) gespalten werden könnte.

### 1.3 Bakterielle Schwefeloxidation

PDOs und deren Gene scheinen sowohl in der Mehrzahl der Genom-sequenzierten Mikroorganismen, als auch in Eukaryoten vorhanden zu sein, während SORs und entsprechende *sor*-Gene auf wenige, meist fakultativ oder obligat chemolithoautotrophe Bakterien oder Archaea beschränkt sind (Wang *et al.*, 2014, Rühl *et al.*, 2017). SORs stellen womöglich physiologisch zentrale Enzyme des oxidativen, dissimilatorischen Schwefelstoffwechsels dar, wobei eukaryotische, mitochondriale

PDOs eine ähnliche Rolle einzunehmen scheinen. Ob dies auch für bakterielle und archaeale PDOs gilt, ist eine offene Frage. *Acidithiobacillus caldus* scheint Schwefel auch in Abwesenheit von *sor*- und *pdo*-Genen oxidieren zu können, während die SOR in archaealen *Acidianus*-Spezies in signifikanten Mengen gebildet wird (Kletzin, 1989, Chen *et al.*, 2012, Wu *et al.*, 2017), womit sich die Frage nach deren Bedeutung und Rolle im Stoffwechsel stellt. Generell sind Schwefelverbindungen für viele (Mikro-)Organismen die Grundlage ihrer Energiekonservierung (Friedrich *et al.*, 2005). Außerdem dienen reduzierte Schwefelverbindungen als Quelle der Schwefel-Assimilation und dem damit verbundenen Einbau in organische Verbindungen.

Die bakterielle Oxidation reduzierter Schwefelverbindungen ist ein wichtiger Bestandteil des Schwefelkreislaufes und hat in

den Bereichen der Landwirtschaft, der Abfallbehandlung, der Biokorrosion mikrobieller Erzlaugungen und in der Primärproduktion vieler Ökosysteme eine große Bedeutung erlangt (Olson *et al.*, 2003, Rohwerder *et al.*, 2003). Frühere Erkenntnisse hatten nahegelegt, dass der dissimilatorische Schwefelstoffwechsel exklusiv in Prokaryoten zu finden sei (Kelly, 1979, Middelburg, 2000) und Eukaryoten lediglich die Möglichkeit besäßen, assimilatorischen Schwefelstoffwechsel zu betreiben. Die dissimilatorische Schwefeloxidation wurde hier ausschließlich auf lithotrophe, bakterielle Endosymbionten zurückgeführt (Dahl *et al.*, 2008a). Die Funktion des hETH1 und auch der humanen Sulfid-Chinon Oxidoreduktase, deren Elektronen zunächst auf den Chinonpool und anschließend auf Komplex III und IV der Atmungskette übertragen werden (Jackson *et al.*, 2012, Landry *et al.*, 2017), deuten jedoch ebenfalls auf einen dissimilatorischen Schwefelstoffwechsel in Eukaryoten hin.

Die hohe Reaktivität von Schwefelverbindungen und die unabhängige Entwicklung verschiedener, auch redundanter, Schwefelabhängiger Oxidoreduktasen, inklusive derer Verbreitung über horizontalen Gentransfer, sind vermutlich die Hauptgründe, weshalb bislang kein universeller Mechanismus der Schwefeloxidation formuliert werden konnte. Hier und im Folgekapitel sollen zentrale Enzymkomplexe bakterieller und archaealer Schwefeloxidationswege vorgestellt werden, um die Einbettung und Vernetzung von SORs und PDOs im Schwefelmetabolismus zu verdeutlichen.

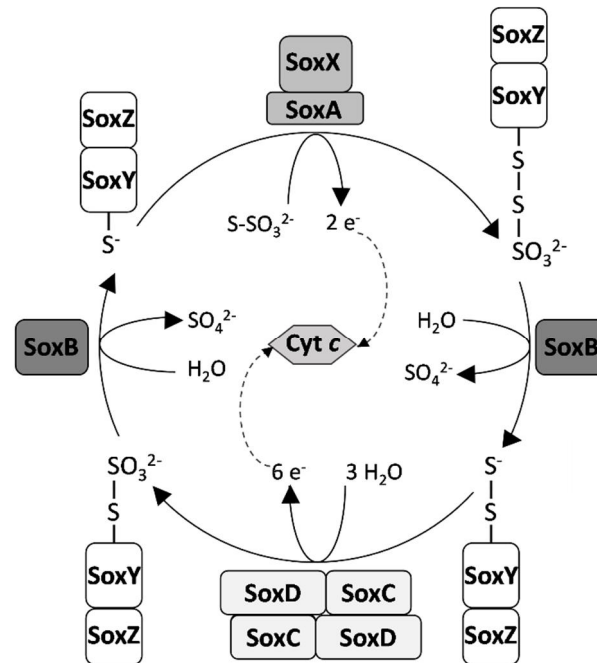
### Der Schwefel Oxidationskomplex aus *Paracoccus pantotrophus*

Das am besten verstandene System der Schwefeloxidation ist der Schwefel Oxidationskomplex (Sox). Das Sox-System ist periplasmatisch lokalisiert und hauptsächlich in mesophilen Bakterien zu finden, die bei neutralem pH wachsen. Mittels dieses Systems können Mikroorganismen eine Vielzahl redu-

zierter Schwefelverbindungen (Thiosulfat, Sulfit, elementarer Schwefel, Sulfid) direkt zu Sulfat oxidieren, wobei Cytochrom c als Elektronenakzeptor genutzt wird.

Das Sox-System ist der zentrale Reaktionsweg der Schwefeloxidation vieler lithotropher Alphaproteobakterien und wurde detailliert für den neutralophilen Schwefeloxidierer *Paracoccus pantotrophus* charakterisiert, wo es sich aus den vier Enzymen SoxXA, SoxB, SoxCD und SoxYZ zusammensetzt (Friedrich *et al.*, 2000, Friedrich *et al.*, 2008). SoxXA bindet zunächst den Sulfanschwefel des Substrates und überträgt ihn kovalent auf die Sulfhydryl-Gruppe eines konservierten Cysteins des SoxYZ Dimers (Abb. 1.9). Beide gebundenen Schwefelatome des Cystein S-Thiosulfonat Derivates ( $\text{SoxYZ-S-S-SO}_3^-$ ) werden anschließend in mehreren Folgereaktionen, bei denen insgesamt sechs Elektronen und zwei Sulfat frei werden, wieder zum ursprünglichen Thiol oxidiert. Die SoxYZ gebundene S-Thiosulfonat-Spezies wird dabei durch SoxB abgespalten, sodass Sulfat entsteht. Das resultierende Cysteinpersulfid ( $\text{SoxY-S-S}^-$ ) wird durch SoxCD weiter zu Cystein-S-Sulfonat oxidiert und Sulfat erneut durch SoxB abgespalten (Rother *et al.*, 2001, Friedrich *et al.*, 2005, Friedrich *et al.*, 2008). Erst kürzlich wurden jedoch Hypothesen über eine Modifikation des Sox-Weges angestellt (Grabarczyk & Berks, 2017). In diesem Modell ist SoxYZ nicht nur Träger von zwei Sulfan-Schwefelatomen ( $\text{SoxYZ-S-S-SO}_3^-$ ), sondern längerer Sulfanschwefelketten ( $\text{SoxYZ-S-(S)}_n\text{-SO}_3^-$ ,  $n \geq 2$ ).

In vielen Mikroorganismen kommt es zu keiner vollständigen Oxidation des Substrates, zumeist aufgrund von fehlenden *soxCD* Genen. In *Allochromatium vinosum* wurden beispielweise diese Gene nicht gefunden (so genannter unvollständiger Sox-Weg), was zur intermediären Ablagerung von  $\text{S}^0$  als Schwefelkugeln führt. Durch das Fehlen von SoxCD kann das SoxYZ gebundene Cysteinpersulfid ( $\text{SoxYZ-S-S}^-$ ) nicht weiter oxidiert werden. Die Schwefelgruppe wird deshalb in revers ar-



**Abbildung 1.9** | Schematische Darstellung der Thiosulfatoxidation durch den Sox-Enzymkomplex in *Paracoccus pantotrophus*. Nach Friedrich *et al.* (2008).

beitende *pathways* der dissimilatorischen Sulfat-Reduktase (rDsr) eingeschleust oder als Schwefelkugeln eingelagert, wobei der zugrundeliegende Mechanismus noch unverständlich ist (Ghosh & Dam, 2009, Welte *et al.*, 2009). Es erscheint jedoch wahrscheinlich, dass Schwefelatome aus den Schwefelkugeln auf eine cytoplasmatische Rhodanase übertragen werden, von wo aus sie über das Schwefelgruppenüberträgerprotein TusA wiederum in den rDsr-*pathway* eingeschleust und dort zu Sulfat oxidiert werden (Stockdreher *et al.*, 2014). In grünen Schwefelbakterien der Gattungen *Chromatiaceae* und *Chlorobi* fehlen ebenfalls *soxCD* Gene (Ghosh & Dam, 2009), wobei auch hier gezeigt wurde, dass die Funktion der Sulfatbildung durch eine oxidative Dsr übernommen werden kann (Gregersen *et al.*, 2011, Holkenbrink *et al.*, 2011). In Organismen mit funktionaler SOR und/oder PDO ist es jedoch ebenfalls denkbar, dass der Schwefel aus Schwefelkugeln direkt von der SOR oder nach Übertragung einer Rhodanase auf GSH von der PDO weiter oxidiert werden kann.

### Schwefelmetabolismus in *Acidithiobacillus caldus*

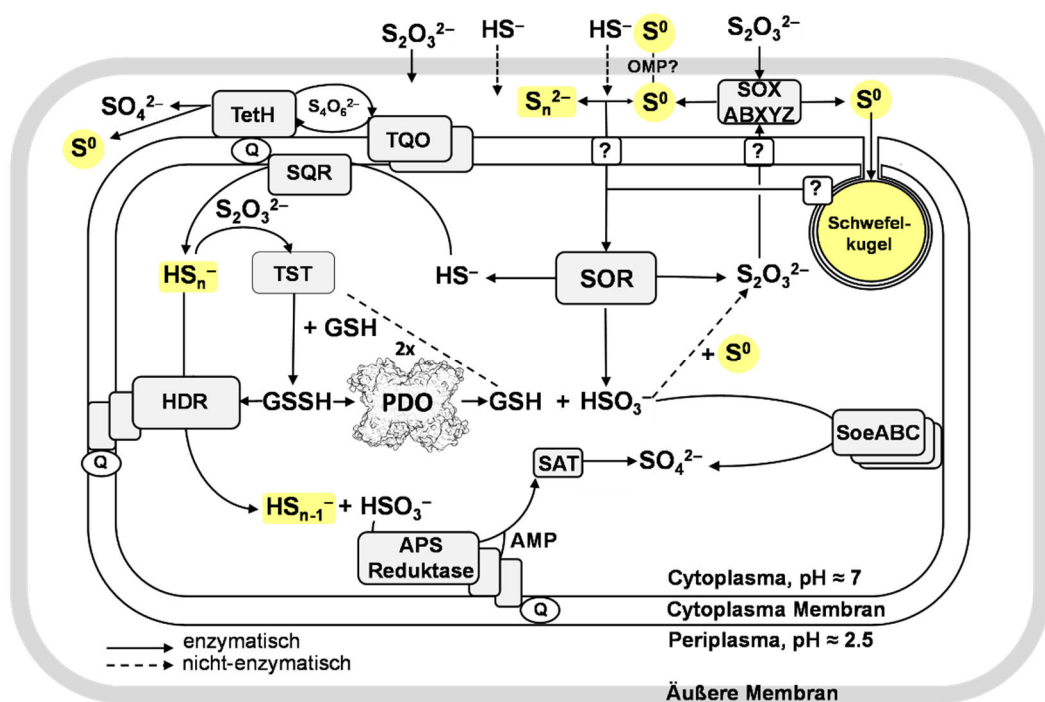
*Acidithiobacillus caldus* ist ein chemolithoautotrophes Gammaproteobakterium, mit einer optimalen Wachstumstemperatur von 45 °C bei pH 2 – 2,5 (Hallberg & Lindström, 1994, Hallberg *et al.*, 1996). Der Organismus oxidiert elementaren Schwefel und andere reduzierte, anorganische Schwefelverbindungen, inklusive vieler Metallsulfide (Hallberg & Lindström, 1994, Hallberg *et al.*, 1996, Kamimura *et al.*, 1999, Edwards *et al.*, 2000). Dementsprechend wurde *At. caldus* als primärer Schwefeloxidierer in Biolaugungsreaktoren identifiziert, weshalb die Untersuchung seines Schwefelstoffwechsels von großem Interesse ist (Amaro *et al.*, 1994, Goebel & Stackebrandt, 1994, Hallberg *et al.*, 1996, Rawlings *et al.*, 1999).

Im hypothetischen Modell der Schwefeloxidation von *At. caldus* (Abb. 1.10) gelangt Octasulfanschwefel über einen noch nicht identifizierten Mechanismus über ein äußeres Membranprotein (*Outer Membrane Protein*, OMP) in das Periplasma. Dabei kommt es ver-

mutlich zu einer Aktivierung des  $S_8$ -Schwefels durch eine reaktive Thiolgruppe (R-SH) des OMP, sodass dieses als lineares Polysulfanintermediat ( $R-(S)_n-S-H$ ) in das Cytoplasma gelangt, wobei auch dieser Mechanismus noch unverstanden ist (Rohwerder & Sand, 2003).

Im Cytoplasma findet anschließend eine Disproportionierungsreaktion der Schwefelkette durch die Schwefel Oxygenase Reduktase (SOR) statt, wobei Schwefelwasserstoff ( $H_2S$ ) und Sulfit entstehen, welches in einer nicht-enzymatischen Reaktion mit Schwefel zusätzlich Thiosulfat bildet. Thiosulfat kann anschließend direkt durch eine membranständige Thiosulfat-Chinon Oxidoreduktase (TQO) zu Tetrathionat oxidiert werden. Eine Tetrathionat Hydrolase (TetH) hydrolysiert dieses wiederum zu Thiosulfat, wobei Sulfat und Schwefel als Nebenprodukte gebildet werden. Die membranständige TQO transfer-

iert dabei Elektronen auf Chinone, die ihrerseits von Chinol-Oxidasen oxidiert werden (Brasseur *et al.*, 2004). Dieser Reaktionsweg wird auch als  $S_4I$ -pathway bezeichnet und die entsprechenden Gene sind in allen publizierten Genomen von *Acidithiobacillus spp.* vorhanden, was auf dessen universelle Wichtigkeit hindeutet (Rzhhepishchevska *et al.*, 2007, Wang *et al.*, 2016). Thiosulfat kann jedoch auch über einen noch nicht bekannten Mechanismus ins Periplasma transferiert werden. Wie in vielen moderat thermophilen und acidophilen Schwefel-oxidierenden Proteobakterien der Gattung *Acidithiobacillus spp.* fehlen *At. caldus* Gene für SoxCD (Valdés *et al.*, 2008, Talla *et al.*, 2014, Christel *et al.*, 2016). Demnach wird Thiosulfat im Periplasma über den unvollständigen Sox-Komplex zu Schwefel und Sulfat oxidiert, wobei dies ebenfalls  $S^0$ -Einlagerungen als Schwefel-



**Abbildung 1.10** | Hypothetisches Modell des oxidativen Schwefelmetabolismus in *At. caldus* basierend auf bioinformatischen Analysen von Schwefelmetabolismus-Proteinen, die im Genom des Organismus kodiert sind. Sox, Schwefeloxidiationskomplex; TQO, Thiosulfat-Chinon Oxidoreduktase; TetH, Tetrathionat Hydrolyase; SQR, Sulfid-Chinon Oxidoreduktase; TST, Thiosulfat-Schwefel Transferase; HDR, Heterodisulfid Reduktase; PDO, Persulfid Dioxygenase; SOR, Schwefel Oxygenase Reduktase; APS, Adenosin-5'-phosphosulfat-(APS)-Reduktase; SAT, ATP Sulfurylase; SoeABC, Sulfit oxidierendes Enzym; Q, Chinon; GSH, reduziertem Glutathion; GSSH, Glutathionpersulfid; OMP, Äußeres Membranprotein.



kugeln zur Folge hat (Hazeu *et al.*, 1988, He *et al.*, 2010). Die Enzyme, welche an der Oxidation des eingelagerten Schwefels beteiligt sind, sowie deren zeitliches Auftreten über die Wachstumsperiode von *At. caldus* sind bislang jedoch unbekannt.

H<sub>2</sub>S wiederum dient als Substrat für die SQR, welche H<sub>2</sub>S mit Chinon als Elektronenakzeptor zu S<sup>0</sup> und/oder zu Polysulfiden oxidiert (Wakai *et al.*, 2004). Eine Rhodanase kann anschließend entweder den Sulfanschwefel des Polysulfides oder des Thiosulfats auf GSH übertragen. Das resultierende GSSH steht daraufhin als Substrat für eine PDO zur Verfügung. Aus der Reaktion resultierendes Sulfit kann anschließend direkt über das membrangebundene Sulfit-oxidierende Enzym (SoeABC) oder über die Adenosin-5'-phosphosulfat-(APS)-Reduktase und die ATP Sulfurylase (SAT) zu Sulfat oxidiert werden (Chen *et al.*, 2012).

*At. caldus* besitzt Gene für zwei verschiedene PDOs (s. Kap. 3) und eine SOR in seinem Genom, wobei das Vorkommen mehrerer Paraloge in verschiedenen *Acidithiobacillus spp.* nichts Ungewöhnliches ist (Wu *et al.*, 2017). Die Funktionen der PDOs und der SOR in *At. caldus* wurde mittels Gendeletion und Überexpression *in vivo* überprüft (Wu *et al.*, 2017). Die Abwesenheit der PDO hatte dabei, trotz ihrer zentralen Rolle im Schwefelmetabolismus von *At. caldus*, weder einen Einfluss auf die Schwefeloxidationsrate noch auf die Wachstumsrate in S<sup>0</sup>-Medium. Eine Deletion des *sor* Gens in *At. caldus* zeigte ebenfalls keine signifikanten Auswirkungen auf das Wachstum (Chen *et al.*, 2012). Die Dreifachdeletionsmutante hatte zwar reduzierte Schwefeloxidationsraten zur Folge, der Organismus konnte jedoch weiterhin wachsen, so dass die genauen Rollen aller drei Proteine im autotrophen Metabolismus von *At. caldus* unklar bleiben. Auch Proteom- und Transkriptomstudien gaben bislang keinen Anhaltspunkt über die Rolle der Proteine im oxidativen Schwefelstoffwechsel von *Acidithiobacil-*

*lus sp.*, wobei jedoch in keiner der bislang veröffentlichten Analysen die drei Gene/Proteine im Fokus standen (Bouchal *et al.*, 2006, Quatrini *et al.*, 2006, Chen *et al.*, 2012, Ouyang *et al.*, 2013, Dekker *et al.*, 2016, Fan *et al.*, 2018).

Es wird angenommen, dass ein membrangebundener Heterodisulfid Reduktase (Hdr)-Komplex ein weiteres Schwefeloxidationssystem im cytoplasmatischen Raum von *Acidithiobacillus spp.* und vielen anderen schwefeloxidierenden Bakterien und Archaea darstellt (Quatrini *et al.*, 2009, Mangold *et al.*, 2011, Chen *et al.*, 2012, Yin *et al.*, 2014, Dahl, 2015, Christel *et al.*, 2016). Es handelt sich dabei um Homologe des HdrABC-Komplexes aus Methanogenen und Sulfat-reduzierenden Archaea bzw. Bakterien, die die reversible Reduktion einer Disulfidbindung vermitteln (Hedderich *et al.*, 2005). Als Substrate dienen dementsprechend Disulfid-Intermediate aus Schwefelübertragungsmolekülen wie GSSH. Im nächsten Schritt wird der R-SSH-Rest oxidiert und frei werdende Elektronen auf den Chinonpool übertragen (Thauer *et al.*, 2008, Kaster *et al.*, 2011, Wagner *et al.*, 2017). Es entstehen Sulfit und der regenerierte R-SH-Rest als Reaktionsprodukte. Es fehlen allerdings biochemische Beweise, die die Funktion von Hdr-ähnlichen Komplexen, wie sie in *Acidithiobacillus spp.* vorkommen, bestätigen. Daher bleibt ihre Existenz und exakte Rolle im Schwefelmetabolismus weiterhin spekulativ (Quatrini *et al.*, 2009). Kürzlich wurde jedoch für ein ähnliches System in *Hyphomicrobium denitrificans* die Oxidation von Thiosulfat zu Sulfit beschrieben (Koch & Dahl, 2018).

Das Vorhandensein von drei verschiedenen Systemen zur Oxidation von Schwefel (PDO, SOR und Dsr) und dem zusätzlichen Vorkommen redundanter Systeme für die Sulfit- und Thiosulfatoxidation (Hdr) in *Acidithiobacillus spp.* verdeutlicht dabei die Vielfalt und Komplexität der elementaren Schwefeloxidation in diesen acidophilen Bakterien.



*al.*, 2015, Berben *et al.*, 2017b, Rühl *et al.*, 2017). Das Bakterium wächst am besten durch aerobe, dissimilatorische Oxidation von Thiosulfat und Thiocyanat, wobei auch Sulfid, Polysulfid und Kohlenstoffdisulfid genutzt werden können (Sorokin *et al.*, 2002). *Tv. paradoxus* wurde aus einem Sodasee in Kenia isoliert und bildet große, nicht-bewegliche Stäbchen (Sorokin *et al.*, 2002). Aufgrund des unvollständigen Sox-Komplexes lagert der Organismus intrazelluläre Schwefelkugeln als Intermediat ein. Abgebaut werden diese unter anderem durch eine cytoplasmatische SOR (Abb. 1.11; Kap. 7). Neben ihr besitzt der Organismus ebenfalls Gene für eine oder mehrere PDOs, die über eine SQR bzw. eine Rhodanase ebenfalls an der Schwefeloxidation zu Sulfid beteiligt ist. Darüber hinaus weist *Tv. paradoxus* eine Operon-ähnliche Anordnung auf, welche die Gene für die dissimilatorische Sulfid-Reduktase (Dsr) und zahlreiche akzessorische Proteine beinhaltet. Beispielsweise wurde für SoxL aus *Al. vinosum* gezeigt, dass es essentiell für die Oxidation des Schwefelkugel-Schwefels ist (Weissgerber *et al.*, 2014). *Al. vinosum* bildet aufgrund eines unvollständigen Sox-Systems ebenfalls Schwefelkugeln in Membranausstülpungen (Hensen *et al.*, 2006). Gene für die Aktivierung und Reduktion von Sulfat (SAT, Apr) sind in *Tv. paradoxus* vorhanden, wobei die Proteine auch für die gegensätzliche Reaktion verantwortlich sein können. Durch die gegenläufige Reaktion würde während der Sulfidoxidation eine Phosphorylierung auf Substratniveau ermöglicht, wie es bereits für Dsr in *Al. vinosum* gezeigt wurde (Dahl *et al.*, 2008b). Ebenso sind Gene für eine Polysulfidreduktase (Psr) vorhanden, wobei kurzkettige Polysulfide anschließend wieder als Substrate für die SOR- und PDO-Reaktionen zur Verfügung stünden. Die terminale Sulfidoxidation kann durch eine membranständige Sulfid Oxidoreduktase vermittelt werden.

Eine unlängst veröffentlichte, vergleichende Transkriptomstudie in dem nahe verwandten *Tv. thiocyanoxidans* untersuchte die Rolle von

Genen, die potentiell am Thiocyanatmetabolismus in Haloalkaliphilen beteiligt sind (Berben *et al.*, 2017a). Darüber hinaus wurden jedoch keine weiteren Studien durchgeführt, welche die Rolle von Genen oder Proteinen des Schwefelmetabolismus in *Thioalkalivibrio sp.* untersuchten. Eine im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte, erste Proteomanalyse eines Vertreters der Gattung *Thioalkalivibrio* sollte Einblicke in die Schwefeloxidation von *Tv. paradoxus* ermöglichen (Kap. 7).

---

## 1.4 Schwefeloxidation in Archaea

---

Neben Böden und Gewässern sind vor allem extreme Standorte Umgebungen, in denen die mikrobielle Schwefeloxidation die vorrangige Reaktion ist. Insbesondere vulkanische Habitate stellen ein Milieu dar, in dem hohe Mengen elementarer Schwefel und anderer anorganischer Schwefelverbindungen vorzufinden sind, welche von Chemolithoautotrophen genutzt werden können. Viele (Hyper-)thermophile Archaea nutzen diese Verbindungen zur Energiekonservierung.

Solfataren, Hydrothermalquellen, Fumarolen und andere schwefelreiche Umgebungen zählen zu den typischen Habitaten dieser Archaea (Abb. 1.12 A). Vor allem in der Ordnung der *Sulfolobales* finden sich viele extrem thermoacidophile Vertreter wieder ( $T_{\text{Opt}} \geq 70^\circ\text{C}$ ,  $\text{pH}_{\text{Opt}}: \leq 3,5$ ), welche eine bemerkenswerte metabolische Vielfalt aufweisen (Kletzin, 2008). Innerhalb der *Sulfolobales* hat sich *Acidianus ambivalens* (Abb. 1.12 B), aufgrund vieler biochemischer Studien der an der Schwefeloxidation beteiligten Enzyme, als ein Modellorganismus herauskristallisiert (Kletzin *et al.*, 2004, Kletzin, 2006).

### Schwefeloxidation in *Acidianus ambivalens*

*Acidianus ambivalens* (früher *Desulfurolobous ambivalens*) ist ein fakultativ anaerobes Archaeon mit optimalen Wachstumsbedingungen von  $80^\circ\text{C}$  bei einem pH von 2,5 (Zillig



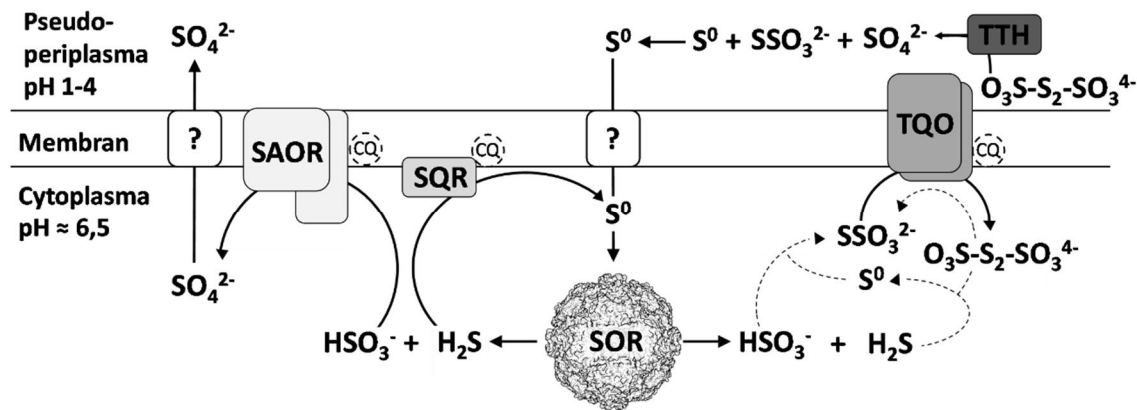
**Abbildung 1.12** | *Acidianus ambivalens* und dessen typisches Habitat. **A**, Fumarole in der Lagune von Furnas auf São Miguel (Azoren, Portugal; Bild: A. Kletzin). **B**, Elektronenmikroskopische Aufnahme eines Ultradünnschnittes von *Ac. ambivalens* (Bild: W. Zillig)

*et al.*, 1986, Fuchs *et al.*, 1996). Trotz des sauren Milieus ist der pH im Zellinneren mit 6,5 dennoch nahezu neutral (Moll & Schäfer, 1988). Der Organismus wächst autotroph durch die Oxidation oder Reduktion von elementarem Schwefel, Tetrathionat und Metallsulfiden (Kletzin, pers. Mitteilung). In Anwesenheit von Sauerstoff oxidiert *Ac. ambivalens*  $S^0$  in verschiedenen Schritten zu Schwefelsäure, wobei Intermediate wie Sulfit, Thiosulfat, Tetrathionat und Sulfit gebildet werden. Der Organismus ist somit maßgeblich an dem sauren Milieu in den entsprechenden Habitaten beteiligt (Zillig *et al.*, 1986). Die Biochemie und die Elektronentransportketten in *Ac. ambivalens* unterscheiden sich jedoch signifikant von den bakteriellen Modellen, beispielsweise durch das Fehlen der Sox-Proteine, wie auch in anderen Archaea.

Der initiale Schritt der Schwefeloxidation wird durch die cytoplasmatische SOR vermittelt (Abb. 1.13; s. Kap. 1.2.2 für Details). Die SOR katalysiert eine sauerstoffabhängige Schwefeldisproportionierungsreaktion von  $S^0$  mit Sulfit und Schwefelwasserstoff als Reaktionsprodukten (Kletzin, 1989). Hierfür muss  $S^0$  zunächst die Cytoplasmamembran durchqueren, wobei der zugrundeliegende Mechanismus ungeklärt ist. Während der SOR-Katalyse findet keine Energiekonservierung statt. Die Reaktion scheint vielmehr dazu zu dienen den nahezu unlöslichen Schwefel für weitere,

membranständige Oxidoreduktasen zugänglich zu machen, welche Elektronen auf Caldariella-Chinone (CQ) übertragen und damit für Elektronentransportprozesse bereitstellen.

Für den energiekonservierenden Reaktionsweg an der Cytoplasmamembran wird Thiosulfat durch eine heterodimere Thiosulfat-Chinon Oxidoreduktase (TQO) zu Tetrathionat oxidiert (Müller *et al.*, 2004). Thiosulfat entsteht dabei durch die nicht-enzymatische Reaktion von Sulfit mit  $S^0$  bei Temperaturen über 50 °C (Roy & Trudinger, 1970, Kletzin, 1989, Rühl *et al.*, 2017). Sulfit wiederum wird direkt durch eine Sulfit-Akzeptor Oxidoreduktase (SAOR) zu Sulfat oxidiert (Zimmermann *et al.*, 1999), wobei das entsprechende Enzym bislang weder isoliert noch in Sequenzvergleichen identifiziert wurde. Eine Sulfid-Chinon Oxidoreduktase (SQR) oxidiert Sulfid zu elementarem Schwefel (Brito *et al.*, 2009), welcher wieder für die SOR-Reaktion als Substrat zur Verfügung steht. Bei allen drei Reaktionen werden Elektronen auf CQ und damit den Chinonpool von *Ac. ambivalens* übertragen. Von dort aus gelangen sie zu terminalen Chinooxidasen, beispielsweise CbsAB-SoxLN (Bandeiras *et al.*, 2009), DoxBCE (Purschke *et al.*, 1997) und den SoxABC und SoxM Komplexen (Lübben *et al.*, 1994a, Lübben *et al.*, 1994b), welche für *Sulfolobales* beschrieben worden sind. Parallel hierzu gibt es in *Ac. ambivalens* einen cyto-



**Abbildung 1.13** | Hypothetisches Modell der Oxidation von elementarem Schwefel in *Ac. ambivalens* nach Kletzin (2008). SAOR, Sulfat-Akzeptor Oxidoreduktase; SQR, Sulfid-Chinon Oxidoreduktase; SOR, Schwefel Oxygenase Reduktase; TQO, Thiosulfat-Chinon Oxidoreduktase; TTH, Tetrathionat-Hydrolase; CQ, Caldariella-Chinon; Durchgehende Pfeile, enzymatische Reaktion; gestrichelte Pfeile, nicht-enzymatische Reaktion.

plasmatischen Weg der Sulfitoxidation über die Adenylsulfat-Reduktase und einer ADP aus AMP-produzierenden Adenylsulfat:Phosphat Adenyltransferase, vergleichbar zu der aus *Thiobacillus denitrificans* (Brüser et al., 2000). Hierbei handelt es sich um eine Substratstufenphosphorylierung (Zimmermann et al., 1999), wobei die entsprechenden Proteine für diesen Reaktionsweg bislang biochemisch nicht charakterisiert wurden. Wird *Ac. ambivalens* mit Tetrathionat kultiviert, kann dies durch eine extrazelluläre Tetrathionat-Hydrolase (TTH) zu Sulfat, Thiosulfat und elementarem Schwefel umgesetzt werden (Protze et al., 2011), welcher wiederum für die SOR als zentrales Enzym des Schwefeloxidationsweges als Substrat zur Verfügung steht.

Obwohl die SOR eine zentrale Rolle im Modell der Schwefeloxidation in *Ac. ambivalens* einnimmt, gibt es bislang keine Transkriptom- und/oder Proteomstudien, die diese Hypothese bestätigen. Darüber hinaus bestehen, trotz intensiver Forschung, weiterhin einige offene Fragen über die allgemeine Funktionsweise und den Reaktionsmechanismus von SORs (inklusive der AaSOR).

## 1.5 Ziele der Arbeit und Kapitelübersicht

Trotz intensiver Forschung an Schwefel und Persulfid (Di-)Oxygenasen sind bislang nur wenige Details zu den zugrundeliegenden Reaktionsmechanismen bekannt. Viele der mehr oder weniger hypothetischen Mechanismen basieren auf generellen Ableitungen verwandter nicht-Häm Eisen-Oxygenasen und fokussieren sich hauptsächlich auf den Substratumsatz am katalytischen Eisenion ohne Berücksichtigung der weiteren Enzymumgebung. Im Rahmen dieser Arbeit sollten die molekularen Mechanismen der Schwefeloxidation von SORs und PDOs mit Hilfe biochemischer, spektroskopischer und struktureller Analysen genauer charakterisiert werden. Darüber hinaus sollte der physiologische Nutzen der SOR aus *Tv. paradoxus* mit Hilfe einer Proteomstudie analysiert und das Enzym in den oxidativen Schwefelmetabolismus des Organismus eingebettet werden. Die Ergebnisse der Arbeit sind in den Kapitel 3 – 7 zusammengefasst:

**Kapitel 3** beschäftigt sich mit den molekularen Mechanismen der AcPDO. Neben einer

grundlegenden biochemischen Charakterisierung des Enzyms wurde die Röntgenkristallstruktur aufgeklärt und spektroskopisch mögliche Eisen-O<sub>2</sub>-(SR)-Intermediate beobachtet. In einer ersten umfassenden Mutagenesestudie in PDOs wurden Aminosäuren identifiziert, die essentiell für die Enzymaktivität und teilweise posttranslational modifiziert sind. Anhand dieser Erkenntnisse wurde ein abgewandelter und erweiterter PDO-Reaktionsmechanismus formuliert.

**Kapitel 4** beinhaltet die biochemische Charakterisierung der *Tp*SOR, inklusive Temperaturoptimum, Denaturierungskinetiken und Mutagenesestudien. Darüber hinaus wurden die SOR-Reaktionsprodukte mittels eines, im Rahmen dieser Arbeit entwickelten, HPLC-gekoppelten Enzymtests quantifiziert und so die Oxygenase- vs. Reduktase-Stöchiometrien in SORs ermittelt.

In **Kapitel 5** liegt der Fokus auf der Aufklärung der *Tp*SOR-Röntgenkristallstruktur und Kryo-EM-Strukturen von *Tp*SOR und *Aa*SOR. Eine vergleichende Strukturanalyse verdeutlicht unterschiedliche Eigenschaften und Konstitutionen der jeweiligen SORs und zeigt in

Kryo-EM-Strukturen verschiedene Modifikationen der nativen Enzyme im Vergleich zu den Röntgenkristallstrukturen.

**Kapitel 6** beschreibt mögliche Substrat- und Produktwege in SORs, ausgehend von einer umfassenden Software-gestützten Tunnel- und Kavitätenanalyse in *Tp*-, *Aa*- und *Hn*SOR. In diesem Zusammenhang wurde ein allgemeines Modell der Substrat- und Produktwegen aufgestellt. Im Weiteren wurden mittels molekularem *Docking* verschiedene Substratbindungszustände an das katalytische Eisenzentrum und an konservierte Cysteine identifiziert und daraus einen möglichen Einfluss auf die Funktionsweise von SORs abgeleitet.

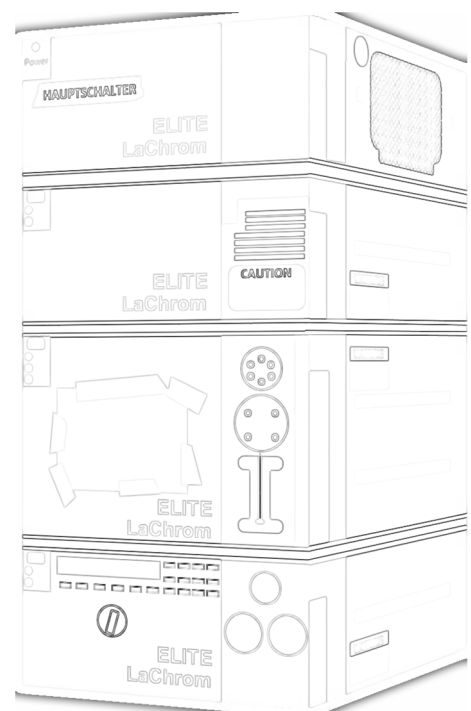
**Kapitel 7** beinhaltet die erste Proteomstudie eines Vertreters der Gattung *Thioalkalivibrio*. Mittels SWATH-LC/MS/MS wurde die Produktion der *Tp*SOR unter physiologischen Wachstumsbedingungen mit Thiosulfat und Thiocyanat als Elektronendonator verifiziert und deren Funktion in den allgemeinen oxidativen Schwefelmetabolismus eingebettet. Darauf aufbauend wurde ein präferierter Weg der Schwefeloxidation in *Tv. paradoxus* formuliert.



# KAPITEL 2

## Material & Methoden

---





# Material

## 2.1 Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure (MES)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
2-4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl-ethansulfonsäure (HEPES)	LS Labor-Service GmbH, Griesheim
2,4,6-Tripyridyl-1,3,5-triazin (TPTZ)	Acros Organics, Geel, Belgien
4-Chloro-1-Naphtol	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Aceton	VWR International GmbH, Darmstadt
Acrylamidlösung (30:0.8); Rotiphorese Gel 30	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Agarose ME	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf
Aldolase	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Aminohexansäure	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Ammoniumacetat	LS Labor-Service GmbH, Griesheim
Ammoniumperoxodisulfat	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Ammoniumsulfid	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Ampicillin	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Anhydrotetracyclin (AHT)	Cayman Chemical, Ann Arbor, USA
$\beta$ -Mercaptoethanol	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Bacto-Agar	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Bacto-Trypton	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
BisTris	GERBU Biotechnik GmbH, Heidelberg
Borsäure	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Bromphenolblau	Merck KGaA, Darmstadt
Calciumchlorid x 2 H <sub>2</sub> O	LS Labor-Service GmbH, Griesheim
Chloroform	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Cobalt-(II)-Chlorid x 6 H <sub>2</sub> O	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Conalbumin	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Coomassie Brilliant Blue G250	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Coomassie Roti Blue, colloidal	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Cytochrom c	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
D-Biotin	IBA Lifesciences, Göttingen
D-Desthiobiotin	IBA Lifesciences, Göttingen
DL-Äpfelsäure <sup>1</sup>	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
di-Kaliumhydrogenphosphat x 3 H <sub>2</sub> O	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Dithiothreitol (DTT)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Eisen-(III)-Chlorid x 6 H <sub>2</sub> O	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Eisen-(III)-Nitrat x 9 H <sub>2</sub> O	Merck KGaA, Darmstadt
Eisen-(II)-Sulfat x 4 H <sub>2</sub> O	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Essigsäure	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Essigsäure (HPLC-Grade)	VWR International GmbH, Darmstadt
Ethanol	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Merck KGaA, Darmstadt
Formaldehyd (37%)	LS Labor-Service GmbH, Griesheim
Fuchsin	Merck KGaA, Darmstadt
Glutaraldehyd	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Glutathion, reduziert (GSH)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Glutathion, oxidiert (GSSG)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Glycerin	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Glycerin <sup>1</sup>	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Glycin	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Guanidinium-Chlorid	Fluka Analytical, St. Gallen, Schweiz
Guanidinium-Thiocyanat	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Harnstoff	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Hefeextrakt, granuliert	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Hexaammin-Cobalt-(III)-Clorid <sup>1</sup>	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
His60 Ni Gravity Columns (1 ml)	Takara Bio Inc., Kusatu, Japan
Hydroxy-Azophenyl Benzoessäure (HABA)	Acros Organics, Geel, Belgien
Hydroxylamin-Hydrochlorid	Alfa Aesar, Karlsruhe
Imidazol	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Iodacetamid (IAA)	AppliChem, Darmstadt
Isoamylalkohol	Merck KGaA, Darmstadt

Isopropylalkohol (2-Propanol)	LS Labor-Service GmbH, Griesheim
Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid (ITPG)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Kaliumcyanid	Merck KGaA, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Kaliumnitrat	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Kaliumthiocyanat	Merck KGaA, Darmstadt
Katalase	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Kupfer-(II)-Chlorid x 2 H <sub>2</sub> O	Merck KGaA, Darmstadt
LB-Agar-Fertigmedium	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Magnesiumchlorid x 6 H <sub>2</sub> O	LS Labor-Service GmbH, Griesheim
Mangan-(II)-Chlorid x 4 H <sub>2</sub> O	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Methanol	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Methanol (HPLC-Grade)	VWR International GmbH, Darmstadt
Methansulfonsäure	Merck KGaA, Darmstadt
Methoxypolyethylen Glycol Maleimid (MalPEG 5 000)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Methylenblau	Merck KGaA, Darmstadt
Monobromobimane	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA / Cayman, Ann Arbor, USA
Natriumacetat x 3 H <sub>2</sub> O	LS Labor-Service GmbH, Griesheim
Natriumacetat <sup>1</sup>	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Natriumcarbonat	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Natriumchlorid	Merck KGaA, Darmstadt
Natriumcitrat x 2 H <sub>2</sub> O	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Natriumdihydrogenphosphat x H <sub>2</sub> O	Merck KGaA, Darmstadt
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Natriumhydrogencarbonat	Merck KGaA, Darmstadt
Natriumhydrogenphosphat x H <sub>2</sub> O	Merck KGaA, Darmstadt
Natriumhydroxid	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Natrium-Kakodylat <sup>1</sup>	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Natriummolybdat x 2 H <sub>2</sub> O	Merck KGaA, Darmstadt
Natriumsulfid x H <sub>2</sub> O	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Natriumsulfit	Merck KGaA, Darmstadt
Natriumthiosulfat x 5 H <sub>2</sub> O	Merck KGaA, Darmstadt
N-Ethylmaleinimid (NEM)	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Nickel-(II)-Chlorid x 6 H <sub>2</sub> O	Merck KGaA, Darmstadt
N,N-Dimethylformamid (DMF)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
N,N-Dimethyl-p-phenyldiamin Dihydrochlorid	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
o-Dianisidin Dihydrochlorid	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Paraformaldehyd	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Pepton	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
PEG 3350 <sup>1</sup>	Alfa Aesar, Haverhill, USA
Phenol (H <sub>2</sub> O gesättigt)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Phosphorsäure	Merck KGaA, Darmstadt
Random Hexamer Primer	Thermo Fisher Scientific Inc., Dreieich
Rinderserumalbumin (BSA)	Roche Diagnostics, Mannheim
Salpetersäure	Merck KGaA, Darmstadt
Salzsäure (37%)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Schwefelpulver	AppliChem, Darmstadt
Silikon-Antischaum	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Strep-Tactin Gravityflow-Säule (1 ml)	IBA Lifesciences, Göttingen
Strep-Tactin XT Gravityflow High Capacity-Säule (1 ml)	IBA Lifesciences, Göttingen
Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Trichloressigsäure (TCA)	IBA Lifesciences, Göttingen
Tricin	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Tris(2-carboxyethyl)phosphin (TCEP)	Alfa Aesar, Haverhill, USA
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Trypton	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Tween20	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Uranylacetat	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Wasser (HPLC-Grade)	VWR International GmbH, Darmstadt
Wasserstoffperoxid (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Zinkacetat x 2 H <sub>2</sub> O	Merck KGaA, Darmstadt
Zinksulfat x 7 H <sub>2</sub> O	Merck KGaA, Darmstadt
Zitronensäure	LS Labor-Service GmbH, Griesheim

<sup>1</sup> Genutzt für Kristallisationsexperimente am ITQB (Oeiras, Portugal)

## 2.2 Mikroorganismen

*Escherichia coli* TOP10F<sup>+</sup>

*Escherichia coli* BL21 (DE3)

*Thioalkalivibrio paradoxus* ARh1<sup>T</sup>

Invitrogen/Life Technologies, Darmstadt

Stratagene (AgilentTechnologies), Waldbronn

Sorokin *et al.* (2002)

## 2.3 Plasmide

pASK-SOR.05	(Urich <i>et al.</i> , 2004)
pASK_HnSOR	(Veith <i>et al.</i> , 2011)
pASK_TpSOR	(Rühl <i>et al.</i> , 2017)
pASK_AcPDO	(Rühl <i>et al.</i> , 2018)
pMW172_hETHE1	(Tiranti <i>et al.</i> , 2006)
pASK_AaSOR_W94E	(Rühl <i>et al.</i> , 2017)
pASK_AaSOR_Y102D	(Rühl <i>et al.</i> , 2017)
pASK_AaSOR_V234E	(Rühl <i>et al.</i> , 2017)
pASK_TpSOR_C44A	(Rühl <i>et al.</i> , 2017)
pASK_TpSOR_C113A	(Rühl <i>et al.</i> , 2017)
pASK_TpSOR_C116A	(Rühl <i>et al.</i> , 2017)
pASK_TpSOR_E106W	(Rühl <i>et al.</i> , 2017)
pASK_TpSOR_D114Y	(Rühl <i>et al.</i> , 2017)
pASK_TpSOR_E236V	(Rühl <i>et al.</i> , 2017)
pASK_HnSOR_C33A	Diese Arbeit
pASK_HnSOR_C103A	Diese Arbeit
pASK_HnSOR_C106A	Diese Arbeit
pASK_HnSOR_C103A/C106A	Diese Arbeit
pASK_AcPDO_T13A	(Rühl <i>et al.</i> , 2018)
pASK_AcPDO_E55A	Diese Arbeit
pASK_AcPDO_E55D	Diese Arbeit
pASK_AcPDO_T56A	(Rühl <i>et al.</i> , 2018)
pASK_AcPDO_H59A	(Rühl <i>et al.</i> , 2018)
pASK_AcPDO_D61A	(Rühl <i>et al.</i> , 2018)
pASK_AcPDO_H62A	(Rühl <i>et al.</i> , 2018)
pASK_AcPDO_C87A	(Rühl <i>et al.</i> , 2018)
pASK_AcPDO_T110A	(Rühl <i>et al.</i> , 2018)
pASK_AcPDO_T114A	Diese Arbeit
pASK_AcPDO_C117A	(Rühl <i>et al.</i> , 2018)
pASK_AcPDO_C117S	(Rühl <i>et al.</i> , 2018)
pASK_AcPDO_T128A	(Rühl <i>et al.</i> , 2018)
pASK_AcPDO_R139A	(Rühl <i>et al.</i> , 2018)
pASK_AcPDO_D141A	(Rühl <i>et al.</i> , 2018)
pASK_AcPDO_D141E	Diese Arbeit
pASK_AcPDO_H171A	(Rühl <i>et al.</i> , 2018)
pASK_AcPDO_Y173A	(Rühl <i>et al.</i> , 2018)
pASK_AcPDO_R190A	Diese Arbeit
pASK_AcPDO_P211A	(Rühl <i>et al.</i> , 2018)
pASK_AcPDO_K212A	(Rühl <i>et al.</i> , 2018)
pASK_AcPDO_H213A	Diese Arbeit
pASK_AcPDO_N221A	Diese Arbeit
pASK_AcPDO_C224A	(Rühl <i>et al.</i> , 2018)
pMW_hETHE1_S100A	Diese Arbeit
pMW_hETHE1_S100C	Diese Arbeit
pMW_hETHE1_C247A	Diese Arbeit

## 2.4 Synthetische Oligonukleotide<sup>1</sup>

Primer Name	Primer Sequenz (5'→3') <sup>2</sup>	RE <sup>3</sup>	Nutzen
ask1b_fwd ask2_rev	AGAGTTATTTTACCACTCCCTATCAG GCGTGAGATCCGTGACGCA	-	Sequenzierung von Expressionsplasmiden
<b>AcPDO</b>			
AcPDO_C87A_fwd AcPDO_C87A_rev	gcTGCaGACCGCAAGGTGG ATCGGCTCCCGCGGC	<i>PstI</i>	Erstellung von Mutationen in Cystein-Codons
AcPDO_C117A_fwd AcPDO_C117A_rev	gcCGTGAGCTATCGtTGGCAC CCcGGgCGTGTTGGCCGGGTGT	<i>SmaI</i>	
AcPDO_C117S_fwd AcPDO_C117S_rev	aGtGTGAGCTATCGCTGGCAC cCCCCGCGTGTTGGCCG	<i>BsaJI</i>	
AcPDO_C137A_fwd AcPDO_C137A_rev	gcCGGcCGTACCGACTTTTCAG GCCGCCAATGAGCAGAGCGTC	<i>EagI</i>	
AcPDO_C180A_fwd AcPDO_C180A_rev	gcgATCGCCGAAGAGAAACGCAGT ACTGACCCAGCGCCCGTGATA	<i>MboI</i>	
AcPDO_C224A_fwd AcPDO_C224A_rev	gcCGGtCGtGAtGACATCGGGAGC ACGCACATTAGCAGGGACCGCTACGTG	$\Delta$ <i>NotI</i>	
AcPDO_R139A_fwd AcPDO_R139A_rev	gcTACCGACTTTTCAGGGCGGC gCCGCAGCCGCCAATGAG	<i>MwoI</i>	
AcPDO_Y173A_fwd AcPDO_Y173A_rev	gcTCACGGcCGCTGGG GTCGTGCCCGGGATAGACCAAG	<i>EagI</i>	Erstellung von Mutationen in Codons Substrat- bindender Aminosäuren
AcPDO_R190A_fwd AcPDO_R190A_rev	gccCTGGCGGGAAAGTCCAGGGAA CGGATTACTGCGTTTCTCTTCGGC	<i>HaeIII</i>	
AcPDO_P211A_fwd AcPDO_P211A_rev	AAACACATaCACGTAGCGGTCCCC GGcTTGGGCCAGATCCAGG	<i>AflIII</i>	
AcPDO_K212A_fwd AcPDO_K212A_rev	gcACACATaCACGTAGCGGTCCC GGGTTGGGCCAGATCCAGGG	<i>AflIII</i>	
AcPDO_T13A_fwd AcPDO_T13A_rev	gCCTACACCTACATCCTGGGCG GCTGCTCTCGGTGTcGAAAAGCTG	<i>TaqI</i>	
AcPDO_T56A_fwd AcPDO_T56A_rev	gCCCACGTCCATGCGGACCAC TTCCAAcCGCTAGCGCAGGGTC	<i>AflIII</i>	
AcPDO_E55A_fwd AcPDO_E55A_rev	GcAACaCACGTCCATGCG CAAAGCGTAGCGCAGGGT	<i>AflIII</i>	Erstellung von Mutationen in Codons Wasserstoffbrücken- ausbildender Aminosäuren um das aktive Zentrum
AcPDO_E55D_fwd AcPDO_E55D_rev	GacACaCACGTCCATGCG CAAAGCGTAGCGCAGGGT	<i>AflIII</i>	
AcPDO_H59A_fwd AcPDO_H59A_rev	gcaGcTgACCACGTcAGCG GACGTGGGTTTCCAAAGCGTAGC	<i>PvuII</i>	
AcPDO_D61A_fwd AcPDO_D61A_rev	GcaCACGTcAGCGCTGC CGCATGGACGTGGGTTTCC	<i>AflIII</i>	
AcPDO_H62A_fwd AcPDO_H62A_rev	gcCGTCAGCGCTGCC GTCCGCATGtACGTGGGTTTCC	<i>RsaI</i>	
AcPDO_T110A_fwd AcPDO_T110A_rev	gCaCCtGGCCACACGCCG TGCCAGTACGCGGATGGC	<i>MscI</i>	
AcPDO_T114A_fwd AcPDO_T114A_rev	gCcCCGGGCTGCGTGAGC GTGcCCGGGTGTTGCCAG	<i>SmaI</i>	
AcPDO_T128A_fwd AcPDO_T128A_rev	gCcGGCGACGCTCTGCTCATTG GAATACGCGATCGTGCCAGCGATAG	<i>MspI</i>	
AcPDO_D141A_fwd AcPDO_D141A_rev	GcCTTcCAGGGCGGC GGTACGCCCGCAGCC	<i>BsaJI</i>	
AcPDO_D141E_fwd AcPDO_D141E_rev	GAaTTcCAGGGCGGCGATG GGTACGCCCGCAGCCGCC	<i>EcoRI</i>	
AcPDO_H171A_fwd AcPDO_H171A_rev	TATCACGGGCGCTGGGTCAG GTCGgcgCCGGGATAGACC	<i>NarI</i>	
AcPDO_H213A_fwd AcPDO_H213A_rev	gcCATaCACGTAGCGGTCC TTTGGGTTGGGCCAGATCC	<i>AflIII</i>	
AcPDO_N221A_fwd AcPDO_N221A_rev	gcTGTGCGCTGCGGCC GGCcGGGACCGCTACG	<i>HaeIII</i>	

Primer Name	Oligonukleotid-Sequenz (5'→3') <sup>1</sup>	RE <sup>2</sup>	Nutzen
<b><i>hETHE1</i></b>			
hETHE1_S100A_fwd	gCTGTCATCTCCCGCCTTAGTGG	<i>Eco64I</i>	Erstellung von Mutationen in Cystein-Codons (analog zur AcPDO)
hETHE1_S100A_rev	CTGGCAcCCAGGGAGGAG		
hETHE1_S100C_fwd	TgTGTCATCTCCCGCCTTAGTGG	<i>Eco64I</i>	
hETHE1_S100C_rev	CTGGCAcCCAGGGAGGAG		
hETHE1_C247A_fwd	gcT GGG GTG CAG ACA CC	<i>AluI</i>	
hETHE1_C247A_rev	GCGCATGTTaGCTGGAACAGC		
<b><i>AaSOR</i></b>			
AaSOR_W94E_fwd	gaGAGTTACTTATTTCAGGCTATGCTATTCATGC	<i>NsiI</i>	Erstellung von Mutationen in Codons mit saurem Aminosäureresten (komplementär zur <i>TpSOR</i> )
AaSOR_W94E_rev	GTTTTGCCTaTGCATTTCTTCATGGTCTTTC		
AaSOR_Y102D_fwd	gATTCA <u>TGCGCa</u> TCACAAATGATATGGGG	<i>FspI</i>	
AaSOR_Y102D_rev	GCATAGCCTGAATAAGTAACTCCAGTTTTGC		
AaSOR_V234E_fwd	GaAATGTATTcG <u>GTCCC</u> AGAAGCAAAGAATACTC	<i>Eco47I</i>	
AaSOR_V234E_rev	ATTATTTGGATCTGGCTCAAGTGATCCAGG		
<b><i>TpSOR</i></b>			
TpSOR_C44A_fwd	gcCCTGGCGACCGCGC	<i>NheI</i>	Erstellung von Mutationen in Cystein-Codons
TpSOR_C44A_rev	CATTTGCTGCTaG <u>CCT</u> GGCG		
TpSOR_C113A_fwd	AAATGCGGCA <u>ACGTG</u> tTGCTG	<i>AflIII</i>	
TpSOR_C113A_rev	ATCGgcCGCGGTCACCAC		
TpSOR_C116A_fwd	AAAgcCGGCAACGTGCTGC	<i>DraIII</i>	
TpSOR_C116A_rev	ATCGC <u>ACGCGGTg</u> ACCACC		
TpSOR_E106W_fwd	tggGATGTGGTGGTGACCGC	<i>BsaI</i>	
TpSOR_E106W_rev	AAAGGTcTCATGAAATTCTTCATGCGCTTCCAG		
TpSOR_D114Y_fwd	tATAAATGCGGCAACGTGCTGCTGG	<i>SphI</i>	
TpSOR_D114Y_rev	<u>GCa</u> tGCGGTCACCACCACATCTTC		
TpSOR_E236V_fwd	GtACGCACCGCGGAAGT <u>GtG</u>	<i>SpeI</i>	
TpSOR_E236V_rev	<u>tAGT</u> TTTCGCGCCCGGGG		
<b><i>HnSOR</i></b>			
HnSOR_C33A_fwd	gcTATCACACGCGCTCG	<i>AvaII</i>	Erstellung von Mutationen in Cystein-Codons
HnSOR_C33A_rev	AACCTTGGGaCCCACTTTCATCATA		
HnSOR_C103A_fwd	<u>gctAG</u> CGGTTGCCTTGGC	<i>NheI</i>	
HnSOR_C103A_rev	CAACTCGAAAATTTCTTTGAAATTATCATGGTGC		
HnSOR_C106A_fwd	gcCCTTGGCATGGTGATC	<i>SfuI</i>	
HnSOR_C106A_rev	ACCGCTGCACAA <u>tTCG</u> AAATTTTC		
HnSOR_C103A/C106A_fwd	GGgcCCTTGGCATGGTGATCGAG	<i>HaeIII</i>	
HnSOR_C103A/C106A_rev	GCTG <u>gcCA</u> ACTCGAAAATTTCTTTG		
<b>qRT-PCR-Analysen</b>			
Tp_sor_fwd	GGAGTCGATCATGGAACGCA	-	qRT-PCR-Analysen von <i>Tv. paradoxus</i> mRNAs
Tp_sor_rev	TCCATTGACCATCACCAC		
Tp_soxA_fwd	TATCGCCGACTTCAACTGCA		
Tp_soxA_rev	ATCGCCTTGCTCCATTCTC		
Tp_pdo_fwd	TCCACGCAGATCACATCACC		
Tp_pdo_rev	CAGCACCAGGTTACCGATCC		
Tp_soeA_fwd	ACCCTGCTGATCTTCATGGC		
Tp_soeA_rev	TCTTGTA <u>CTCG</u> CGGTTCTCG		
Tp_dsrA_fwd	TCAACGTGATGACCAAGGCA		
Tp_dsrA_rev	CCTCTTCCGTCTCGAGCTTC		
Tp_scn_fwd	CCGAACGTCAAGGACCTGAA		
Tp_scn_rev	CCAGTCGATCTTGTTGCCCT		
Tp_rpoB_fwd	TGACCGAGAATGGCACCTTC		
Tp_rpoB_rev	CTTCTGCGAACTGTGGGTCT		

<sup>1</sup> Synthetische Oligonukleotide wurden von Sigma-Aldrich Chemie GmbH (München) bezogen.<sup>2</sup> Restriktionsschnittstellen unterstrichen; nicht-komplementäre Nukleotide sind kleingeschrieben.<sup>3</sup> Restriktionsenzym zur analytischen Restriktionsspaltung des resultierenden Plasmids.

## 2.5 Enzyme, Kits und Größenstandards

Enzyme	
DNaseI (50 U/ $\mu$ l, RNase-frei)	Thermo Fisher Scientific Inc., Dreieich
<i>Dpn</i> I (20 U/ $\mu$ l)	New England Biolabs GmbH, Frankfurt
Restriktionsendonukleasen	New England Biolabs GmbH, Frankfurt / Thermo Fisher Scientific Inc., Dreieich
Revert Aid Reverse Transkriptase	Thermo Fisher Scientific Inc., Dreieich
RiboLock RNase Inhibitor (400 U/ $\mu$ l)	Thermo Fisher Scientific Inc., Dreieich
T4 DNA-Ligase (400 U/ $\mu$ l)	New England Biolabs GmbH, Frankfurt
T4 Polynukleotidkinase (5 U/ $\mu$ l)	New England Biolabs GmbH, Frankfurt
Q5 High-Fidelity DNA-Polymerase (2 U/ $\mu$ l)	New England Biolabs GmbH, Frankfurt
Kits	
E.Z.N.A Plasmid Mini Kit I	Omega Bio-Tek Inc., Norcross USA
GenElute Bacterial Genomic DNA Kit	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
GenElute PCR Clean-Up Kit	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Monolith NT Protein Labeling Kit RED-NHS	Nanotemper Technologies GmbH, München
Größenstandards	
EZ-Run Prestained Rec Protein Ladder	Thermo Fisher Scientific Inc., Dreieich
GeneRuler DNA Ladder Mix	Thermo Fisher Scientific Inc., Dreieich
Unstained Protein MW Marker	Thermo Fisher Scientific Inc., Dreieich
SERVA Native Marker Liquid Mix	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg

## 2.6 Medien

Kultivierung <i>E. coli</i>			
LB-Flüssigmedium (1l)		LB-Festmedium (1l)	
Trypton	10 g	Trypton	10 g
Hefeextrakt	5 g	Hefeextrakt	5 g
NaCl	10 g	NaCl	10 g
	pH 7,2	Agar	15 g
			pH 7,2
Kultivierung <i>Tv. paradoxus</i>			
Mineralisches Basismedium (1l)		SL8-Spurenelementlösung (1l)	
Natriumcarbonat	20 g	CuCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	10 mg
Natriumhydrogencarbonat	10 g	CoCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O	200 mg
Natriumchlorid	5 g	EDTA	5 mg
di-Kaliumhydrogenphosphat	1 g	FeSO <sub>4</sub> x 4 H <sub>2</sub> O	2 mg
	pH 10,0	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	300 mg
	(sterilfiltriert)	MnCl <sub>2</sub> x 4 H <sub>2</sub> O	30 mg
		NaMoO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	30 mg
SL8-Spurenelementlösung	2 ml	NiCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O	20 mg
MgCl <sub>2</sub> -Lösung	1 ml	ZnSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	100 mg
		MgCl <sub>2</sub> -Lösung	
		MgCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O	200 g/l
		Thiosulfat-Lösung	
		Na-Thiosulfat x 5 H <sub>2</sub> O	2 M (40 mM) <sup>1</sup>
		Nitrat-Lösung	
		Kaliumnitrat	1 M (10 mM) <sup>1</sup>
		Thiocyanat-Lösung	
		Kaliumthiocyanat	2 M (15 mM) <sup>1</sup>

<sup>1</sup> Werte in Klammern geben die Endkonzentration an, wie sie für die Kultivierung verwendet wurden

## 2.7 Puffer und Lösungen

### Gelelektrophorese

Agarose-Gelelektrophorese		SDS-Gelelektrophorese	
<b>50 x TAE-Puffer</b>		<b>10 x Anodenpuffer</b>	
Tris	2 M	Tris/HCl	2 M
Essigsäure	1 M		pH 8,9
EDTA	50 mM	<b>10 x Kathodenpuffer</b>	
	pH 8,0	Tris/HCl	1 M
<b>10 x DNA-Auftragspuffer</b>		Tricin	1 M
Bromphenolblau	0,25 % (w/v)	SDS	1 % (w/v)
Saccharose	50 % (w/v)		pH 8,45
EDTA	100 mM	<b>3 x SDS- Proteinauftragspuffer</b>	
	pH 8,0	Tris/HCl	125 mM (pH 6,8)
<b>Polyacrylamid-Gelelektrophorese für kleine Nukleinsäuren</b>		Glycerin	20 % (w/v)
<b>10 x TBE-Puffer</b>		SDS	4 % (w/v)
Tris	890 mM	Bromphenolblau	0,2 % (w/v)
Borsäure	890 mM	β-Mercaptoethanol	10 % (v/v)
EDTA	20 mM	<b>3 x Schagger Gelpuffer</b>	
<b>Häm-Färbung</b>		Tris/HCl	3 M (pH 8,45)
<b>Häm-Färbelösung (100 ml)</b>		SDS	0,3 % (w/v)
o-Dianisidin	100 mg	<b>2 x SDS-Probenauftragspuffer (nicht-reduzierend)</b>	
Natriumcitrat (pH 4,4)	50 mM	Tris/HCl	38 mM (pH 6,8)
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , 30 % (w/w)	200 µl	Glycerin	10 % (w/v)
		SDS	6 % (w/v)
		Bromphenolblau	0,1 % (w/v)
		<b>SDS-Entfärbelösung</b>	
		Essigsäure	10 % (v/v)
		Methanol	20 % (v/v)
<b>Native Polyacrylamid-Gelelektrophorese</b>			
<b>10 x Nativer Probenauftragspuffer</b>		<b>10 x Nativer Anodenpuffer</b>	
BisTris	100 mM (pH 7,0)	BisTris/HCl	500 mM (pH 7,0)
Glycerin	10 % (w/v)	<b>10 x Nativer Kathodenpuffer</b>	
		BisTris/HCl	150 mM (pH 7,0)
		Tricin	500 mM

### RNA-Isolation

Lösung D		TE-Puffer	
Guanidiniumthiocyanat	4 M	Tris/HCl	20 mM (pH 8,0)
Natriumcitrat	25 mM	EDTA	1 mM
N-Lauroylsarcosin	0,3 % (v/v)		
β-Mercaptoethanol	0,1 M		

## Genexpression und Proteinreinigung

Anhydrotetrazyklin-Lösung	
AHT	2 mg/ml in DMF
Puffer W	
Tris/HCl	100 mM (pH 8,0)
NaCl	150 mM
Puffer R	
Tris/HCl	100 mM (pH 8,0)
NaCl	150 mM
HABA	1 mM
Puffer E	
Tris/HCl	100 mM (pH 8,0)
NaCl	150 mM
D-Desthiobiotin	2,5 mM
Puffer BXT	
Tris/HCl	100 mM (pH 8,0)
NaCl	150 mM
D-Biotin	50 mM

Eisen-(III)-Citrat-Lösung	
Eisen-(III)-Chlorid	100 mM
Citrat	100 mM
His-Äquilibrationpuffer	
Natrium-Phosphat	50 mM (pH 7,4)
NaCl	300 mM
Imidazol	20 mM
His-Elutionspuffer	
Natrium-Phosphat	50 mM (pH 7,4)
NaCl	300 mM
Imidazol	300 mM
His-Waschpuffer	
His-Äquilibrationpuffer	929 ml
His-Elutionspuffer	71 ml
His-Regenerationspuffer	
MES	20 mM (pH 5,0)
NaCl	300 mM

## Proteingehaltsbestimmung

Bradford Reagenz	
Coomassie G250	0,01 % (w/v)
Ethanol	4,75 % (v/v)
o-Phosphorsäure	8,5 % (v/v)

## Western-Analyse

10 x PBS (1l)	
NaCl	72,0 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	14,2 g
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O	2,8 g
Entwicklerlösung	
4-Chloro-1-Naphtol	30 mg
Ethanol (100 %)	5 ml
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , 30 % (v/v)	20 µl
1 x PBS	15 ml

Anodenpuffer I	
Tris/HCl	0,3 M (pH 10,4)
Methanol	20 % (v/v)
Anodenpuffer II	
Tris/HCl	25 mM (pH 10,4)
Methanol	20 % (v/v)
Kathodenpuffer	
Tris/HCl	25 mM (pH 9,4)
Methanol	20 % (v/v)
Aminohexansäure	40 mM

## HPLC-Analysen

HEPES-Puffer	
HEPES	50 mM (pH 8,0)
EDTA	5 mM



## Enzymaktivitätstests und kolorimetrische Nachweisreaktionen

Enzymtestpuffer		
Tris/HCl	70 mM	pH 7,2 <i>Aa</i> SOR
Tween 20	0,1 % (v/v)	pH 8,0 <i>Hn</i> SOR
Schwefel, elementar	2 % (w/v)	pH 9,0 <i>Tp</i> SOR
Schwefel per Ultraschall dispergiert.		pH 7,5 AcPDO/hETHE1
Thiosulfat-Quantifizierung		Sulfit-Quantifizierung
Methylenblau	12 mg/l in 5 M HCl	Fuchsin 0,04 % (w/v) in 12,5 % Schwefelsäure
H <sub>2</sub> S-Quantifizierung		Eisen-Quantifizierung
Zinkacetat-Lösung		TPTZ-Lösung
Zinkacetat	2,6 % (w/v)	TPTZ 4 mM in 10 mM HCl
Essigsäure	0,1 % (v/v)	
FeCl <sub>3</sub> -Lösung		Per-/Polysulfid-Quantifizierung
Eisen-(III)-Chlorid	11,5 mM in 0,6 M HCl	Goldstein-Reagenz
		Eisen-(III)-Nitrat x 9 H <sub>2</sub> O 2,5 % (w/v)
		Salpetersäure 26,25 % (v/v)
N,N-dimethyl- <i>p</i> -phenylendiamin-Lösung		
N,N-dimethyl- <i>p</i> -phenylendiamin x 2 HCl	0,1 % (w/v) in 5 M HCl	

## Methoden

### 2.8 Mikrobiologische Methoden

#### 2.8.1 Kultivierung von *E. coli*

*E. coli* Top10F<sup>+</sup> bzw. -BL21 Codon Plus-Flüssigkulturen wurden in LB-Medium bei 37 °C aerob und schüttelnd (180 rpm) inkubiert, sofern nicht anders angegeben. Die Kultivierung auf LB-Festmedien erfolgte ebenfalls bei 37 °C. Bei Bedarf wurden 100 µg/ml Ampicillin zur Selektion verwendet.

#### 2.8.2 Kultivierung von *Tv. paradoxus*

*Thioalkalivibrio paradoxus* ARh1<sup>T</sup>-Kulturen wurden aerob bei 30 °C in mineralischem Basismedium bei pH 10 kultiviert. Bei der Verwendung von 40 mM Thiosulfat als Energiequelle wurde dem Medium 10 mM Nitrat hinzugefügt und die Zellen schüttelnd (120 rpm) bei einem Flüssigkeit: Luft Verhältnis von 1:5 inkubiert. Die Kultivierung mit 15 mM Thio cyanat erfolgte stehend bei einem Flüssigkeit: Luft Verhältnis von 1:10.

#### 2.8.3 Phasenkontrast-Mikroskopie

Phasenkontrastmikroskopie wurde mit einem *Axioskop 2* Mikroskop durchgeführt, gekoppelt an eine *AxioCam MRm* Kamera (Carl Zeiss Mikroskopie GmbH, Jena). Die Bildanalyse erfolgte mit der Software *AxioVision* (V. 4.8).

#### 2.8.4 Transmissions-Elektronenmikroskopie (TEM)

TEM-Analysen erfolgten mit einem *Zeiss EM109 Elektronenmikroskop*, gekoppelt an eine *Gatan MultiScan 600 W* Kamera. Hierfür wurden 5 µl einer spät-exponentiellen *Tv. paradoxus*-Kultur entnommen und auf kohlenstoffbeschichtete Kupfer-Netze gegeben (Plano GmbH, Wetzlar). Nach 5 min wurde die Flüssigkeit mit Filterpapier entfernt, die Netze für weitere 5 min an der Luft getrocknet

und anschließend für elektronenmikroskopische Aufnahmen verwendet.

#### 2.8.5 Raster-Elektronenmikroskopie (SEM)

SEM-Analysen erfolgten in einem Raster-elektronenmikroskop (FEI ESEM Quanta 200 FEG, Eindhoven, Niederlande) in Kombination mit energiedispersiver Röntgenspektroskopie (EDX, Oxford Instruments, Abingdon, UK). Hierfür wurden kohlenstoffbeschichtete Kupfer-Netze (Plano GmbH, Wetzlar) mit 5 ml Zellsuspension in einer Petrischale bedeckt und die Zellen für mindestens 1 h sedimentieren gelassen. Zur Fixierung der Zellen wurde die Suspension abgenommen und die Zellen über Nacht bei 4 °C mit 2 % (w/v) Paraformaldehyd und 1 % (v/v) Glutaraldehyd in mineralischem Basismedium vollständig überschichtet. Die Zellen wurden anschließend für 1 min in 2 % Uranylacetat (pH 6,0, maleinsäurehaltig) gefärbt und dreimal mit ddH<sub>2</sub>O gewaschen. Das Kupfer-Netz wurde vorsichtig mittels Filter-Papier getrocknet und bis zu den SEM-Analysen in einem Kieselgel-beinhaltenden Exsikkator bei Raumtemperatur gelagert.

### 2.9 Molekularbiologische Methoden

#### 2.9.1 Ortsgerichtete Mutagenese

Für die ortsgerechte Mutagenese wurden die bereits zuvor hergestellten Expressionsplasmide pASK-SOR.05, pASK\_HnSOR, pASK\_TpSOR, pASK\_AcPDO und pMW172\_hETHE1 als *template* verwendet (Abb. 2.1). Mutationen in verschiedenen Codons wurden durch inverse PCR-Amplifikation des jeweiligen Plasmids mit den entsprechenden *back-to-back* Mutagenese-Primern erstellt (Hemsley *et al.*, 1989). Neben der gewünschten Mutation beinhalteten die Oligonukleotide eine stille Mutation zur Einbringung einer Restriktionsenzym-Erkennungs-

stelle, um bereits vor einer Sequenzierung mutagenisierte von Wildtyp-Plasmiden, nach entsprechender hydrolytischer Spaltung, unterscheiden zu können. Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)-Ansätze wurden in 50 µl Reaktionsvolumen angesetzt und die Reaktion anschließend in einem PCR-Thermocycler gestartet (Tab. 2.1 und 2.2).

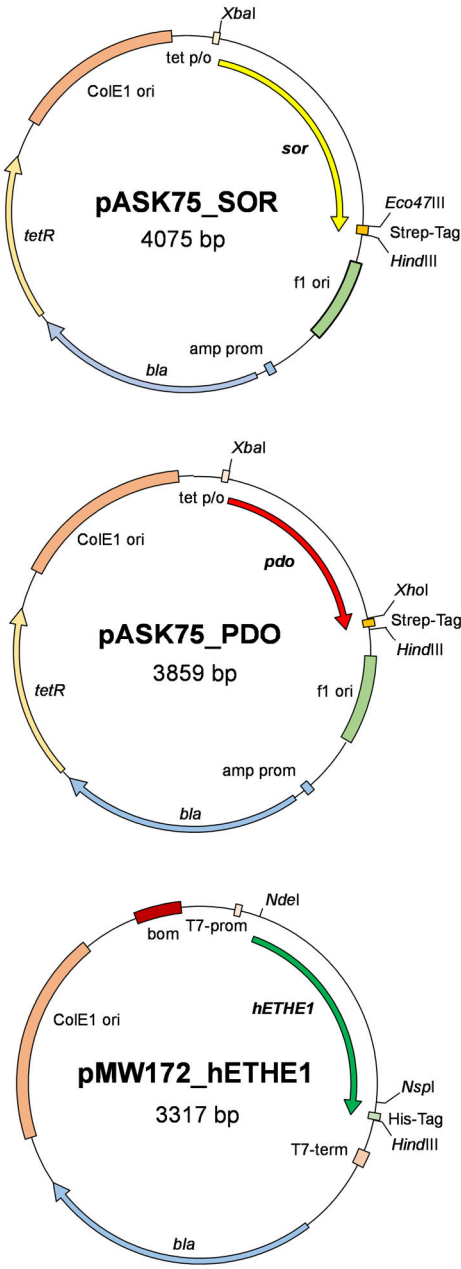
**Tabelle 2.1** | Zusammensetzung der Komponenten für die Mutagenese-PCR.

Komponenten	Volumen	c (final)
5xQ5 Reaktionspuffer	10 µl	1 x
Q5 DNA Polymerase	0,5 µl	0,02 U/µl
25 mM dNTPs	0,4 µl	200 µM
50 mM Primer (fwd)	0,5 µl	0,5 µM
50 mM Primer (rev)	0,5 µl	0,5 µM
Template DNA	variabel	1 ng
ddH <sub>2</sub> O	ad 50 µl	

**Tabelle 2.2** | Thermocycling-Bedingungen der PCR Ansätze. T<sub>m</sub>; Schmelzpunkt des jeweiligen Primer-paares.

Schritt	T (°C)	t (s)	# Zyklen
Initiale Denaturierung	98	30	1
Denaturierung	98	10	5
Primer-Annealing	T <sub>m</sub> -3	30	
Elongation	72	150	27
Denaturierung	98	10	
Primer-Annealing	T <sub>m</sub>	30	
Elongation	72	150	1
Finale Elongation	72	120	
Kühlung	4		

Die Amplifikation wurde mittels Agarose-Gelelektrophorese verifiziert und die PCR-Produkte für 2 h mit 10 U *DpnI* inkubiert. Die Ansätze wurden anschließend mittels des *GenElute PCR Clean-Up Kits* aufgereinigt und die Amplifikate in einem Volumen von 17 µl eluiert. Hierzu wurden 2 µl 10 x DNA Ligasepuffer, 10 U T4 Polynukleotidkinase und 400 U T4 DNA Ligase hinzugefügt und für 2 h bei 37 °C inkubiert, gefolgt von einer Hitzein-



**Abbildung 2.1** | Plasmidkarten der Plasmide pASK\_SOR, pASK\_PDO und pMW172\_hETHE1, welche zur heterologen Genexpression in *E. coli* genutzt wurden. Für die Expression der SOR ist exemplarisch der pASK\_SOR.05 Vektor gezeigt, der das *sor* Gen aus *Ac. ambivalens* beinhaltet. Die Vektoren für das *sor* Gen aus *Tv. paradoxus* und *H. neapolitanus* unterscheiden sich lediglich anhand ihrer Größe (4 096 bzw. 4 090 Nukleotide). *pdo* und *sor* Gene stehen unter der Kontrolle eines Tetrazyklin-Promotors (*tet p/o*) mit einer C-terminalen Strep-Tag-Fusion. Das *hethe1* Gen aus dem Vektor pMW172\_hETHE1 steht unter der Kontrolle eines T7-Promotors mit einer C-terminalen His-Tag-Fusion. *bla*: Beta-Lactamase-Gen; *tetR*: Tetrazyklin-Repressor; *ori*: Replikationsursprung; *bom*: Basis der Mobilitätsregion aus pBR 322.

aktivierung für 10 min bei 80 °C und Transformation von *E. coli* TOP10F<sup>+</sup> Zellen mit 10 µl des Ligationsansatzes. Die resultierenden Plasmide wurden mit den jeweiligen Restriktionsendonukleasen hydrolytisch gespalten, mittels Agarose-Gelelektrophorese analysiert und sequenziert (Seqlab, Göttingen oder Eurofins Genomics, Ebersberg).

### 2.9.2 Agarose-Gelelektrophorese

Agarose-Gelelektrophoresen wurden zur analytischen Auftrennung von DNA-Fragmenten durchgeführt. Hierfür wurde 1% [w/v] Agarose in 1 x TAE-Puffer gelöst und das Gel mit 0,5 x TAE-Puffer überschichtet. DNA-Proben wurden mit 10 x DNA-Auftragspuffer versetzt und auf das Gel aufgetragen. Als Größenstandard dienten 7 µl des *GeneRuler Ladder Mix* (Thermo Fisher Scientific, Sankt Leon-Rot). DNA-Fragmente wurden bei konstanten Spannungen zwischen 100 und 120 V aufgetrennt. Die Färbung erfolgte mittels Ethidiumbromid (0,02 % [v/v]) für 10 min bei gleicher Entfärbezeit in dH<sub>2</sub>O. Alternativ wurde dem Gel unmittelbar vor dem Gießen *Serva DNA Stain Clear G* (6 µl / 100 ml) zugefügt. Die Bandendetektion erfolgte mittels UV-Illuminator.

### 2.9.3 Transformation von *E. coli* und Analyse von Transformanten

#### Herstellung kompetenter *E. coli* BL21 (DE3)

40 ml LB-Medium wurden mit 200 µl einer *E. coli* Übernachtskultur inokuliert und bei 30 °C schüttelnd bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,6 inkubiert. Die Kultur wurde für 10 min auf Eis gekühlt und die Zellen sedimentiert (5 000 x g; 5 min; 4 °C). Das Sediment wurde in 2,7 ml eiskalter 100 mM CaCl<sub>2</sub>-Lösung resuspendiert und 2,3 ml eiskalte 50%ige Glycerin-Lösung hinzugefügt. Aliquotierte Zellen wurden in flüssigen Stickstoff gefroren und bei -80 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

#### Hitzeschock-Transformation

Für die Transformation wurden 50 µl kompetente *E. coli* mit 10 µl Ligationsansatz bzw. 1 ng Plasmid (TOP10F<sup>+</sup>) oder 100 ng Plasmid (BL21) gemischt und für 30 min bei 4 °C inkubiert. Der Hitzeschock erfolgte für 1 min bei 42 °C. Anschließend wurden die Zellen auf Eis gekühlt, 1 ml LB-Medium hinzugefügt und für 30 – 45 min bei 37 °C (800 rpm) in einem Thermoschüttler (Eppendorf, Wessling-Berzdorf) inkubiert. 100 µl des Ansatzes wurden auf selektiven Festmedium ausplattiert.

Für die Isolation der Plasmid-DNA wurden 5 ml einer Übernachtskultur sedimentiert (13 000 x g, 1 min) und das Plasmid mittels des *E.Z.N.A Plasmid Mini Kit I* nach Angaben des Herstellers isoliert. Die Bestimmung des DNA-Gehalts erfolgte per Spektralphotometer (NanoDrop ND-1000, Peqlab, Erlangen).

### 2.9.4 RNA-Isolation aus *Tv. paradoxus*

Die RNA-Isolation wurde mittels der modifizierten Säure-Guanidiniumthioyanat-Phenol-Chloroform-Extraktion (Chomczynski & Sacchi, 2006) durchgeführt. Hierfür wurde die Zellkultur zunächst sedimentiert (5 000 x g, 15 min, 4 °C) und das Sediment anschließend in 500 µl Denaturierungslösung (Lösung D) resuspendiert. Dem Ansatz wurden 50 µl 2 M Natriumacetatlösung (pH 4,0), 500 µl Wasser-gesättigtes saures Phenol und 105 µl Chloroform-Isoamylalkohol (49:1 [v/v]) zur Extraktion von Proteinen, Lipiden und DNA hinzugefügt. Der Ansatz wurde auf einem Vortex gemischt und für 15 min bei 4 °C inkubiert. Die Trennung der wässrigen und organischen Phase erfolgte durch Zentrifugation (13 000 x g, 20 min, 4 °C). Die wässrige Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt, und zur Präzipitation der RNA 1 ml Isopropylalkohol (IPA) hinzugefügt. Der Ansatz wurde invertiert und für mindestens 1 h bei -20 °C inkubiert.

Die RNA wurde sedimentiert (13 000 x g, 20 min, 4 °C), in 0,3 ml Lösung D resuspendiert und für 2 min bei 65 °C unter leichtem Schütteln inkubiert. Dem Ansatz wurde, zur Extraktion unerwünschter organischer Bestandteile, ein Volumen Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (25:24:1 [v/v]; PCI) hinzugefügt, auf einem Vortex gemischt und die Phasen durch Zentrifugation separiert (13 000 x g, 5 min, 4 °C). Dieser Schritt wurde einmal wiederholt, die wässrige Phase in ein neues Reaktionsgefäß überführt, ein Volumen IPA hinzugefügt und für mindestens 1 h bei -20 °C inkubiert.

RNA-Präzipitate wurden sedimentiert (13 000 x g, 10 min, 4 °C), das Sediment in einem Volumen 70%igen eiskaltem Ethanol gewaschen und im Anschluss erneut sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen und präzipitierte RNA in einer Vakuum-Zentrifuge (Eppendorf AG, Hamburg) für 5-10 min bei 60 °C getrocknet. Das Sediment wurde in 50 µl TE-Puffer (pH 8,0) solubilisiert und kurz schüttelnd bei 37 °C inkubiert.

Die Konzentration der RNA wurde mittels Spektralphotometer (PepLab, Erlangen) bestimmt und die Hydrolyse der DNA im Anschluss in einem Volumen von 50 µl angesetzt (Tab. 2.3). Der Hydrolyse-Ansatz wurde für 90 min schüttelnd bei 37 °C inkubiert, weitere 10 U DNaseI hinzugefügt und nochmals für 90 min schüttelnd bei 37 °C inkubiert.

**Tabelle 2.3** | Zusammensetzung der Komponenten für die DNA-Hydrolyse.

Komponenten	Volumen	c (final)
10 x DNase Puffer	5 µl	1 x
RiboLock RNase Inhibitor	0,2 µl	8 U
DNaseI	10 µl	10 U
RNA	variabel	20 µg
ddH <sub>2</sub> O	ad 50 µl	

Das Volumen des Ansatzes wurde mit TE-Puffer (pH 8,0) auf 200 µl ergänzt, 20 µl 3 M Natriumacetat (pH 4,6) und ein Volumen PCI hinzugegeben. Das Gemisch wurde auf einem

Vortex gründlich gemischt und wässrige und organische Phase mittels Zentrifugation (13 000 x g, 5 min, 4 °C) getrennt. Die wässrige Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt, ein Volumen PCI hinzugefügt, gründlich gemischt und die Phasentrennung wiederholt. Nach zweimaliger Wiederholung der Prozedur mit einem Chloroform-Isoamylalkohol-Gemisch (49:1 [v/v]) wurde die wässrige Phase in ein neues Reaktionsgefäß überführt, ein Volumen IPA zugefügt und für mindestens 2 h bei -20 °C inkubiert.

Das RNA-Präzipitat wurde sedimentiert (13 000 x g, 20 min, 4 °C), das Sediment in 70%igen eiskaltem Ethanol gewaschen und erneut sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen, das Präzipitat in einer Vakuum-Zentrifuge getrocknet (5-10 min; 60 °C), anschließend in 21 µl TE Puffer (pH 8,0) solubilisiert und kurz bei 37 °C inkubiert. Die gereinigte RNA wurde für die Erstellung komplementärer DNA (cDNA) genutzt.

**2.9.5 Quantitative Reverse-Transkriptase PCR (qRT PCR)**

Für die Untersuchung der transkriptionellen Aktivität wurde die gereinigte RNA zunächst in cDNA transkribiert (Tab. 2.4). Hierzu wurden *Random Hexamer Primer* genutzt und jeweils zwei Ansätze mit und ein Ansatz ohne reverser Transkriptase angesetzt (Thermocycling Bedingungen: 25 °C, 10 min; 42 °C, 60 min; 70 °C, 10 min). Als Kontrolle wurde genomische *Tv. paradoxus* DNA genutzt, die mit dem *GenElute Bacterial Genomic DNA Kit* (Sigma-Aldrich), nach Angaben des Herstellers isoliert und in einer 1: 1 000 Verdünnung anstelle der gereinigten RNA eingesetzt wurde.

qRT Analysen wurden mittels des *StepOnePlus Real-Time PCR Systems* in Kombination mit der *StepOnePlus Software v2.3* (Applied Biosystems, Waltham, USA) und dem *SensiFast SYBR Hi-ROX Kit* nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

**Tabelle 2.4** | Zusammensetzung der Komponenten für die cDNA-Synthese.

Komponenten	Volumen	c (final)
5 x RT Puffer	4 µl	1 x
RiboLock RNase Inhibitor (400 U/µl)	0,5 µl	20 U
10 mM dNTPs	2 µl	1 mM
Random Hexamer Primer (0,2 µg/µl)	0,5 µl	0,1 µg
Revert Aid Reverse Transcriptase	1 µl	200 U
RNA	variabel	3 µg
TE Puffer (pH 8,0)	ad 20 µl	

Die relative Transkriptmenge wurde anhand des jeweiligen Schwellwertzyklus ( $C_T$ -Wert) auf das Haushaltsgen *rpoB1* (GenBank: AHE99252) normiert. Jede Probe wurde in Triplikaten gemessen und die Signifikanz mittels ungepaarten, zweiseitigen *t*-Test bestimmt.

## 2.9.6 Heterologe Genexpression in *E. coli*

*E. coli* BL21 Expressionskulturen wurden, ausgehend von 20 ml Vorkulturen, auf eine  $OD_{600}$  von 0,05 eingestellt und ca. 50 µl Silikon-Antischaum hinzugefügt. Die Expression des *sor* bzw. des *pdo* Gens wurde bei Erreichen einer  $OD_{600}$  von 0,8 durch Zugabe von Anhydrotetracyclin (AHT, 200 µg/l Kultur) induziert, die des *hethe1* Gens durch Zugabe von 10 mM Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG). Um einen ausreichenden Eiseneinbau zu gewährleisten, wurde zeitgleich zur Induktion der Kultur 100 µM Eisen-(III)-Citrat-Lösung zugegeben. Die Expressionskulturen wurden für 12-20 h schüttelnd (180 rpm) bei 37 °C inkubiert.

## 2.10 Biochemische Methoden

### 2.10.1 Reinigung rekombinanter SOR/PDO aus *E. coli*

*E. coli* BL21 Zellen der Expressionskulturen wurden sedimentiert (10 000 x g, 10 min,

4 °C) und im ≈ 50-fachen Volumen Waschpuffer (Puffer W) gelöst. Die Zellen wurden erneut sedimentiert und anschließend im fünf-fachen Volumen Puffer W aufgenommen. Der Zellaufschluss erfolgte mittels Ultraschall für 10 min (*Branson Sonifier* 250, Stufe 5, Mikrospritze [5 mm], 100% Arbeitszyklus). Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt (10 000 x g, 10 min, 4 °C) wurden partikuläre Bestandteile des Überstandes, der das lösliche SOR- bzw. PDO/hETHE1-Protein enthält, in einer Ultrazentrifuge sedimentiert (100 000 x g, 30 min, 4 °C, 55.2 Ti, Beckman Instruments, Brea, USA). Der Überstand wurde durch einen 0,22 µm Spritzenfilter (Rotilabo-Spritzenfilter, Carl Roth GmbH, Karlsruhe) sterilfiltriert um kleinpartikuläre Bestandteile vor der Säulenaффinitätschromatographie zu entfernen.

Die Reinigung der rekombinanten SOR bzw. PDO erfolgte mittels Strep-Tag-Säulenaффinitätschromatographie. Das filtrierte Homogenisat wurde auf eine 1 ml Strep-Tactin *Superflow* Tropfsäule (IBA, Göttingen) aufgetragen, gefolgt von fünf Waschschritten mit jeweils 1 Säulenvolumen (*column volume*; CV) Puffer W. Das Protein wurde mit 6 x 0,5 CV Puffer E eluiert und die Säule anschließend mit 3 x 5 CV Puffer R regeneriert. Anschließend erfolgte ein Waschschriff mit 100 mM Tris-Lösung (2 x 5 CV), gefolgt von der Äquibrierung der Säule mit 2 x 4 CV Puffer W.

Alternativ erfolgte die Reinigung mittels 1 ml Strep-Tactin XT *Superflow* Säulen (IBA, Göttingen), die an einer Peristaltikpumpe mit einer Flussrate von ≈ 0,5 ml/min angeschlossen waren. Nach Applikation des Überstandes wurden die Säulen mit 5 CV Puffer W gewaschen und die Proteine mit 4 ml Puffer BXT eluiert. Es folgte ein Regenerationsschritt mit 2 CV 10 mM NaOH und einer Flussgeschwindigkeit von ≈ 1 ml/min, gefolgt von einem Waschschriff mit 8 CV Puffer W.

Das hETHE1-Protein wurde mittels His-Tag-Aффinitätschromatographie gereinigt. Hierfür wurden *His60 Ni Gravity* Tropfsäulen

mit 1 ml Bettvolumen (Takara Bio Inc., Kyoto, Japan) mit 2 x 5 CV Äquilibriumspuffer äquilibriert. Die Säulen wurden anschließend unten verschlossen, 5 CV Homogenisat aufgetragen, oben verschlossen und 5-10 min horizontal rotierend inkubiert. Ungebundenes Ly-sat wurde anschließend durch Öffnen der Säule verworfen. Dies wurde so lange wiederholt bis das gesamte Homogenisat verbraucht wurde. Anschließend wurden 2 x 5 CV Äquilibriumspuffer auf die Säule gegeben, gefolgt von 2 x 5 CV Waschpuffer. Die Elution des Proteins erfolgte durch die Zugabe von 10 x 1 CV Elutionspuffer, gefolgt von der Regeneration der Säule mit 4 x 5 CV Äquilibriumspuffer und 2 x 5 CV Regenerationspuffer. Abschließend wurde die Säule mit 1 x 5 CV ddH<sub>2</sub>O gewaschen und in 5 CV 20% Ethanol gelagert.

Für Nachfolgeanwendungen wurde überschüssiges Imidazol mittels PD10 Entsalzungssäulen, welche Sephadex G25 als Säulenmaterial beinhalteten (GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg), nach Angaben des Herstellers entfernt, das gereinigte hETHE1 Protein in flüssigen Stickstoff gefroren und bei -20 °C gelagert.

## 2.10.2 Proteinquantifizierung

Die Quantifizierung von Proteinen erfolgte anhand der Bradford-Methode (Bradford, 1976). 20 µl Proteinlösung wurden mit 980 µl Bradford-Reagenz gemischt und für 5 min inkubiert. Die Absorption wurde bei 595 nm gegen den Reagenzienleerwert bestimmt. Die Kalibrationsgerade erfolgte auf Basis einer Rinderserumalbumin (BSA)-Eichreihe.

## 2.10.3 Natriumdodecylsulfat Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Denaturierende SDS-PAGE wurde mit 10% Acrylamid Tris-Tricin Gelen (Schägger & von Jagow, 1987) durchgeführt (Tab. 2.5). Die Proteinproben wurden vor dem Auftrag mit

3 x SDS-Probenauftragspuffer versetzt und für 5 min bei 95 °C denaturiert. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte mit dem *Mini-PROTEAN Tetra Electrophoresis System* (BioRad, Hercules, USA) bei einer konstanten Spannung zwischen 100-120 V (*peqPOWER E250*, PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen). Die Gele wurden über Nacht in kolloidaler Coomassie-Lösung gefärbt und anschließend mit Entfärbelösung gewaschen.

**Tabelle 2.5 |** Zusammensetzung von Polyacrylamidge-len nach Schägger & von Jagow (1987).

	4 % Sam-melgel	10 % Trenngel
Rotiphorese Gel 30	2 ml	9 ml
3 x Schägger Puffer	3,5 ml	9 ml
60 % (w/v) Glycerin	-	3 ml
ddH <sub>2</sub> O	9 ml	6 ml
10 % (w/v) APS	40 µl	40 µl
TEMED	200 µl	200 µl

## 2.10.4 Polyacrylamid-Gelelektrophorese kleiner Nukleinsäuren

Die analytische Auftrennung kleiner Nukleinsäuren erfolgte mit Polyacrylamidgelen (Tab. 2.6). Produkte der qRT-PCR-Analysen wurden in DNA-Auftragspuffer aufgenommen und im *Mini-PROTEAN Tetra Electrophoresis System* (BioRad, Hercules, USA) bei einer konstanten Spannung von 100 V (*peqPOWER E250*, PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen) in 0,5 x TBE-Puffer aufgetrennt. Die Färbung der Gele erfolgte in Ethidiumbromid (0,02 % [v/v]) für 10 min bei gleicher Entfärbzeit in dH<sub>2</sub>O. Die Bandendetektion erfolgte mittels UV-Illuminator.

**Tabelle 2.6 |** Zusammensetzung von Polyacrylamid-gelen zur Trennung von kleinen Nukleinsäuren.

	10 % Trenngel
Rotiphorese Gel 30	12 ml
10 x TBE-Puffer	1,8 ml
ddH <sub>2</sub> O	22,2 ml
10 % (w/v) APS	400 µl
TEMED	40 µl

### 2.10.5 Häm-Färbung

Die Häm-Färbung wurde zur selektiven Färbung von Cytochromen c angewandt (Francis & Becker, 1984). Hierfür wurden 100 µg Protein des *Tv. paradoxus* Homogenisates mittels SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend für 30 min mit 12,5 % (w/v) Trichloressigsäure im Gel fixiert. Das Gel wurde folgend 3 x für 10 min mit ddH<sub>2</sub>O gewaschen und anschließend mit Häm-Färbelösung für 90 min schwenkend inkubiert.

### 2.10.6 MalPEG Gel Shift Assay

Cystein-Modifikationen wurden mittels eines Gel Shift Assays nach Derivatisierung des Proteins mit MalPEG (Methoxypolyethylenglykol Maleimid; MW 5 000; Sigma-Aldrich) durchgeführt (Lu & Deutsch, 2001). Hierfür wurden 0,5 mg/ml Protein in Puffer W mit 5 mM *N*-Ethylmaleinimid (NEM) für 30 min bei 30 °C inkubiert und anschließend mit 2,5 mM MalPEG unter identischen Bedingungen derivatisiert. Für die Derivatisierung unter reduzierenden Bedingungen wurden 5 mM Dithiothreitol (DTT) nach dem NEM Inkubationsschritt hinzugefügt und ebenfalls für 30 min bei 30 °C inkubiert. Anschließend wurde DTT und überschüssiges NEM mittels einer Zentrifugationssäule (Roti-Spin MINI-3, 3 MWCO; Roth) entfernt und die Säule dreimal mit Puffer W gewaschen. Das Protein wurde daraufhin mit MalPEG, wie oben beschrieben, derivatisiert. Die Reaktion wurde schlussendlich durch die Zugabe von 0,3 Volumen nicht denaturierenden SDS-Auftragspuffer gestoppt und die Proteine anschließend mittels SDS-PAGE aufgetrennt.

### 2.10.7 Western-Analyse

Für Western-Analysen wurde gereinigtes Protein mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Eine PVDF-Membran (Roti-Fluoro PVDF, Carl Roth, Karlsruhe) wurde anschließend für 1 min in Methanol getränkt und für 5 min in Anodenpuffer II gewaschen. Für die Übertra-

gung auf die Membran wurden vier Whatman-Papiere in Anodenpuffer I getränkt und mit zwei in Anodenpuffer II getränkten Whatman-Papieren überschichtet, gefolgt von der PVDF-Membran, dem SDS-Gel und sechs in Kathodenpuffer getränkten Whatman-Papieren. Die Übertragung auf die PVDF Membran erfolgte für 1,5 h bei 0,8 mA/cm<sup>2</sup> (Semi Dry Transfer Cell, Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA) mit anschließender schwenkender Inkubation der Membran für 4 h in 1 x PBS-Puffer mit 3 % (w/v) BSA. Anschließend wurden 10 µl Biotin-Blocking-Puffer (IBA, Göttingen) hinzugegeben und für weitere 10 min inkubiert. Die Membran wurde folgend für 5 min mit 15 ml PBS gewaschen.

Durch die C-terminale Fusion eines Strep-Tags an die AcPDO wurde die Visualisierung des Proteins durch Inkubation mittels eines *StrepMAB-Classical*-HRP-gekoppelten Antikörpers (IBA, Göttingen) durchgeführt. Hierfür wurde die Membran mit dem Antikörper für 1 h Stunde inkubiert und anschließend zweimal in 10 ml PBS mit 0,1 % (v/v) Tween 20 und einmal in PBS für jeweils 15 min gewaschen. Die anschließende Chloronaphtol-Färbung erfolgte nach Angaben des Herstellers bis zur gewünschten Intensität der chromogenen Reaktion. Die Reaktion wurde durch Waschen der Membran mit ddH<sub>2</sub>O gestoppt.

### 2.10.8 Native Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Nicht-denaturierende native Polyacrylamid-Gelelektrophorese (Wittig & Schagger, 2005) wurde mit *SERVAGel N 4-16*, Vertikal-Nativgel-Fertiggelen (Serva, Heidelberg) durchgeführt.

Hierfür wurden 20 µg gereinigtes Protein mit 10 x nativen Probenauftragspuffer versetzt. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte mit dem *Perfect Blue™ Vertical Double Gel System* (Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen) bei einer konstanten Spannung von 150 V (*peqPOWER E250*, PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen). Die Gele wurden über



Nacht in kolloidaler Coomassie-Lösung gefärbt und anschließend mit Entfärbelösung gewaschen.

Der relative Mobilitätskoeffizient ( $R_f$ ) der Proteine wurde anhand des Quotienten aus der Migrationsdistanz der Proteine und der Bromphenolblaubande bestimmt, wobei die SERVA Native Marker Proteine als Standard genutzt wurden.

### 2.10.9 Gelpermeationschromatographie

Die Gelpermeationschromatographie zur Bestimmung der apparenten molekularen Massen erfolgte mittels eines Äkta-Systems (Äkta Purifier 10, GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg). Hierfür wurden 1 mg gereinigtes Protein in einer 150  $\mu$ l Auftragsschleife auf eine Superose 6 HR 10/300 Gelpermeationssäule (GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg) mit einem Bettvolumen von 23,5 ml aufgetragen. Die Kalibrierung der Säule erfolgte mit Puffer W und einer Flussrate von 0,5 ml/min. Als Standards wurden Cytochrom c, Conalbumin, Aldolase und Katalase verwendet. Die Berechnung der apparenten molekularen Masse erfolgte mittels des Verteilungskoeffizienten ( $K_{av}$ ), über das Retentionsvolumen ( $V_e$ ), dem Säulenvolumen ( $V_c$ ) dem Molekulargewicht ( $M_w$ ) und dem Totvolumen ( $V_0$ ; Gl. VII).

$$(VII) \quad K_{av} = (V_e - V_0) \cdot (V_c - V_0)^{-1}$$

### 2.10.10 Enzym-Aktivitätstest

Mittels Enzymaktivitätstests wurden die spezifischen Aktivitäten der SOR- bzw. PDO-Präparationen bestimmt.

#### SOR-Aktivitätstests.

Der initial beschriebene SOR-Enzymtest (Kletzin, 1989) wurde in dieser Arbeit sowohl zur Erhöhung der Sensitivität und der Reaktionsproduktbildung als auch zur Reduktion der Menge an benötigten Enzym und der kürzeren Inkubationszeit des Enzymtests modifiziert (Rühl & Kletzin, 2017).

Für den SOR-Enzymtest wurden unter Rühren je 1 ml eines sonifizierten Schwefel-haltigen Enzymtestpuffers in Reaktionsgefäße überführt und diese für 5 min auf die gewünschte Reaktionstemperatur schüttelnd (800 rpm, Thermoschüttler) vorgeheizt (AaSOR: 85 °C, TpSOR/HnSOR: 80 °C). Anschließend wurden definierte Mengen gereinigtes Protein (meist 1 – 5  $\mu$ g) in eines der Reaktionsgefäße überführt. Dies wurde für 150 s in 30 s Intervallen wiederholt und die Reaktionsgefäße sofort nach Enzymzugabe des letzten Reaktionsgefäßes zum Abstoppen der Reaktion in ein Eiswasserbad überführt (Abb. 2.2 A). Die Reaktionsgefäße wurden für 2-3 min im Eisbad inkubiert und elementarer Schwefel anschließend sedimentiert (13 000 x g, 1 min). Der Überstand wurde für die Quantifizierung der Reaktionsprodukte verwendet (s. Kap. 2.10.13, Sulfit-, Thiosulfat- bzw. H<sub>2</sub>S-Quantifizierung). Die kolorimetrisch bestimmten Mengen von Sulfit und Thiosulfat wurden für jeden Zeitpunkt addiert, um die endgültige Menge an oxidierten Produkten zu ermitteln. Die spezifischen Aktivitäten wurden aus dem linearen Anstieg der Reaktionsprodukte berechnet. Eine Unit (U) Enzymaktivität ist als 1  $\mu$ mol Sulfit plus Thiosulfat (Oxygenase) bzw. 1  $\mu$ mol Schwefelwasserstoff (als Sulfid; Reduktase) pro Minute definiert.

#### PDO-Aktivitätstests.

Der PDO-Enzymtest wurde in dieser Arbeit auf Basis des modifizierten SOR-Enzymtests entwickelt.

Vor Beginn des Enzymtests wurden je 50  $\mu$ l Fuchsin-Lösung in sechs 1,5 ml Reaktionsgefäße vorgelegt. Unter Rühren wurden 2 ml eines sonifizierten Schwefel-haltigen Enzymtestpuffers in je ein 2 ml-Reaktionsgefäß überführt und 1 mM reduziertes Glutathion (GSH) hinzugefügt. Im Reaktionsansatz wurde auf elementaren Schwefel als Co-Substrat verzichtet, sobald Glutathion Persulfid (GSSH) als Substrat verwendet wurde. Der enzymfreie Reaktionsansatz wurde für 5 min bei

40 °C schüttelnd (800 rpm, Thermoschüttler) zur Temperaturanpassung inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 1 – 2,5 µg/ml Enzym gestartet und sofort 250 µl des Enzymtestansatzes in eines der Reaktionsgefäße mit 50 µl Fuchsinlösung überführt (t = 0 s). Auf gleiche Weise wurden in 10 s Intervallen jeweils 250 µl Enzymtestansatz in Fuchsinlösung überführt und so, durch Fällung des Proteins in schwefelsaurer Lösung, die Reaktion gestoppt (Abb. 2.2 B).

Anschließend wurden 200 µl ddH<sub>2</sub>O zu jedem der Reaktionsgefäße hinzugefügt und die Ansätze für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Folgend wurden 5 µl 37% Formaldehyd zu den Ansätzen zugegeben und der elementare Schwefel sedimentiert (13 000 x g, 1 min). Der Überstand wurde in eine Halbmikroküvette überführt und die OD<sub>570</sub> nach 60 min gegen ddH<sub>2</sub>O bestimmt. Die kolorimetrisch bestimmten Mengen Sulfit und Thiosulfat (letzteres nur bei Reaktionstemperaturen über 50 °C, s. Kap. 2.10.13; Thiosulfat-Quantifizierung) wurden zu jedem Zeitpunkt addiert um die finale Produktmenge zu er-

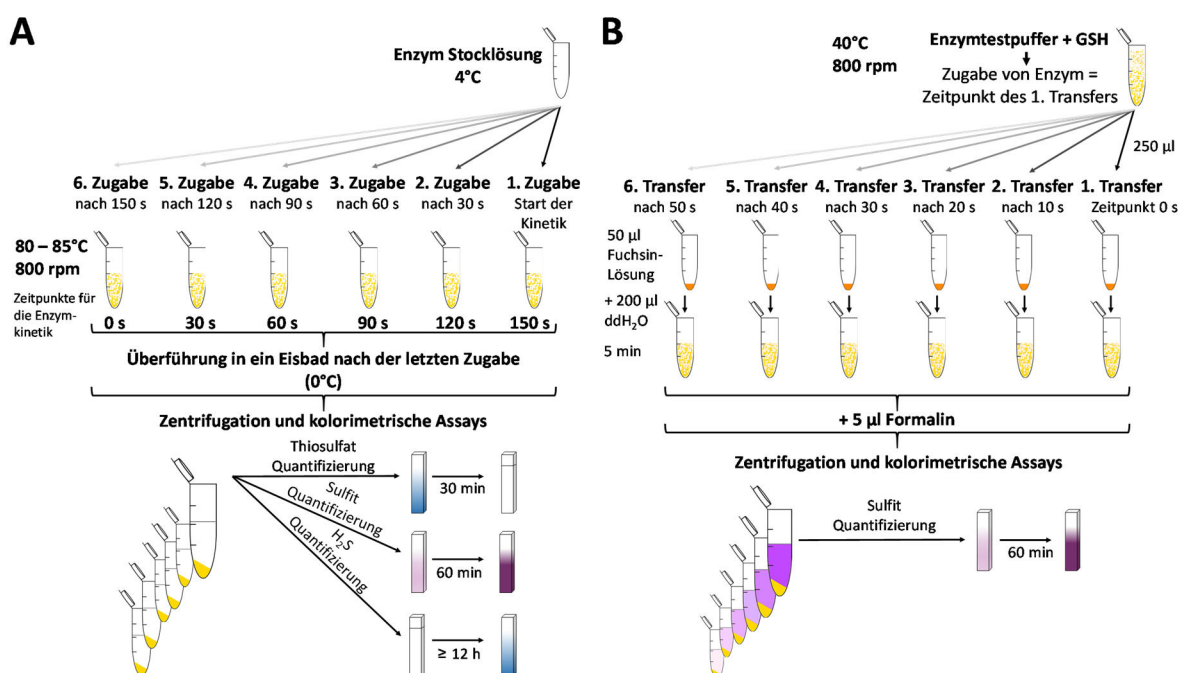
mitteln. Die spezifischen Aktivitäten wurden aus dem linearen Anstieg der Reaktionsprodukte kalkuliert. Eine Unit (U) Enzymaktivität ist als 1 µmol Sulfit (plus Thiosulfat) pro Minute definiert.

### 2.10.11 GSSH-Synthese

Die Glutathion Persulfid (GSSH) Synthese wurde mittels drei verschiedener Methoden durchgeführt.

(1) Eine Methode wurde bereits beschrieben (Visser *et al.*, 1997, Liu *et al.*, 2014) und leicht modifiziert. Ungefähr 20 mM elementarer Schwefel wurden über Nacht in Aceton gelöst und mit gleichem Volumen einer 20 mM GSH-Lösung in 20 mM Kalium-Phosphat-Puffer, pH 7,4 gemischt. Der Ansatz wurde für mindestens 5 min inkubiert und das Aceton für 15 min bei 30 °C in einer Vakuumzentrifuge verdampft.

(2) Eine zweite Methode zur GSSH-Herstellung bestand darin, dass 1 mM GSH in Schwefel-haltigen Reaktionspuffer (pH 7,5) gegeben wurde und der Ansatz für 10 min bei 80 °C erhitzt wurde. Abschließend wurde der



**Abbildung 2.2** | Schematische Übersicht der Enzymaktivitätstest und der kolorimetrischen Nachweisreaktionen. **A**, SOR-Enzymtest mit Thiosulfat-, Sulfit- und Sulfid-Quantifizierung. **B**, PDO-Enzymtest mit Sulfit-Quantifizierung.

elementare Schwefel sedimentiert (13 000 x g, 1 min) und der Überstand für weitere Analysen verwendet.

(3) Die dritte Methode zur GSSH-Synthese wurde standardmäßig verwendet und basierte auf der Reaktion von oxidierten Glutathion (GSSG) mit Natriumsulfid (Kabil & Banerjee, 2012).

50 mM GSSG wurden in einem zuvor anaerobisierten 300 mM Natrium-Phosphat-Puffer, pH 7,4 gelöst und in einer Anaerobenkammer (Coy, <0,5 ppm O<sub>2</sub>) mit 200 mM Natriumsulfid gemischt. Das Gefäß wurde luftdicht verschlossen und für 30 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz in der Anaerobenkammer in 100 µl Aliquote aufgeteilt und bis zur weiteren Verwendung luftdicht bei -20 °C gelagert.

Die GSSH-Konzentrationen wurden anschließend mittels kalter Cyanolyse bestimmt (s. Kap. 2.10.13, Per-/ bzw. Polysulfid-Quantifizierung).

### 2.10.12 Polysulfid-Synthese

Die Synthese von Polysulfiden erfolgte durch die Mischung von elementarem Schwefel und Ammoniumsulfid unter Ausschluss von Sauerstoff (Findlay & Kamysny, 2017). 2 M elementarer Schwefel in anaerobisierten Wasser und 1 M Ammoniumsulfid-Lösung wurden gemischt. Der Ansatz wurde anaerobisiert und unter Rühren für mindestens 12 h inkubiert. Die Polysulfid-Konzentration wurde mittels kalter Cyanolyse bestimmt (s. Kap. 2.10.13, Per-/ bzw. Polysulfid-Quantifizierung).

### 2.10.13 Kolorimetrische Bestimmungen von Schwefelverbindungen und Eisen

#### Sulfit-Quantifizierung

Sulfit reduziert Fuchsin und bildet mit Formaldehyd eine stabile lila-gefärbte Verbindung (Pachmayr, 1961).

Für die Reaktion wurden 50 µl Fuchsin-Lösung in Reaktionsgefäßen vorgelegt und

250 µl Enzymtestansatz hinzugefügt. Nach Zugabe von 200 µl ddH<sub>2</sub>O und 5-minütiger Inkubation wurde dem Ansatz 5 µl 37 % Formaldehyd hinzugegeben. Im Anschluss wurde der elementare Schwefel sedimentiert und der Ansatz in eine Halbmikroküvette überführt. Nach 60 min wurde die OD<sub>570</sub> gegen ddH<sub>2</sub>O als Referenz bestimmt. Die Kalibration erfolgte anhand einer mit Natriumsulfit erstellten Eichreihe (Abb. 2.3 A).

#### Thiosulfat-Quantifizierung

Die Quantifizierung von Thiosulfat basiert auf der Entfärbung von Methylenblau durch Thiosulfat (Pachmayr, 1961).

750 µl Methylenblau-Lösung wurden zu 250 µl Reaktionsansatz gegeben und der Ansatz für 30 min inkubiert. Die Absorption (OD<sub>670</sub>) wurde im Anschluss gegen ddH<sub>2</sub>O als Referenz ermittelt. Die Kalibration erfolgte anhand einer mit Natriumthiosulfat erstellten Eichreihe (Abb. 2.3B).

#### H<sub>2</sub>S-Quantifizierung

Die Quantifizierung von Schwefelwasserstoff (H<sub>2</sub>S, in Lösung als Sulfid) basiert auf der Fe<sup>3+</sup>-Ionen katalysierten Bildung von Methylenblau aus Sulfid und N,N-dimethyl-*p*-phenylendiamin (King & Morris, 1967). Die Reagenzien wurden in der folgenden Reihenfolge zugefügt:

250 µl Zinkacetat-Lösung  
350 µl Enzymtestansatz  
125 µl N,N-dimethyl-*p*-phenylendiamin-Lsg.  
50 µl FeCl<sub>3</sub>-Lösung

Nach 12-24 h Inkubation wurde die OD<sub>670</sub> gegen ddH<sub>2</sub>O als Referenz ermittelt. Die Kalibration erfolgte anhand einer mit Ammoniumsulfid erstellten Eichreihe (Abb. 2.3C)

#### Per-/ bzw. Polysulfid-Quantifizierung

Per- bzw. Polysulfide wurden mittels kalter Cyanolyse quantifiziert (Wood, 1987). 100 µl GSSH- bzw. Polysulfid-beinhaltendes Reaktionsgemisch wurde zu 80 µl 1 M NaOH, 670 µl ddH<sub>2</sub>O und 100 µl 0,5 M Kaliumcyanid-Lö-

sung gegeben. Der Ansatz wurde für 45 min inkubiert und anschließend 20  $\mu\text{l}$  37 % (v/v) Formaldehyd und 200  $\mu\text{l}$  Goldstein-Reagenz hinzugegeben (Goldstein, 1950). Die Absorption wurde bei 460 nm gegen den Reagenzienleerwert bestimmt. Die Kalibration erfolgte anhand einer mit Kaliumthiocyanat erstellten Eichgeraden (Abb. 2.3 D).

### Eisen-Quantifizierung

Die Quantifizierung des Eisens aus Enzympräparationen erfolgte mittels der 2,4,6-Tripyridyl-1,3,5-triazin (TPTZ) Methode (Fischer & Price, 1964). Hierbei bildet TPTZ zusammen mit  $\text{Fe}^{2+}$ -Ionen einen stabilen blauen Komplex, der bei einer  $\text{OD}_{593}$  quantifiziert werden kann.

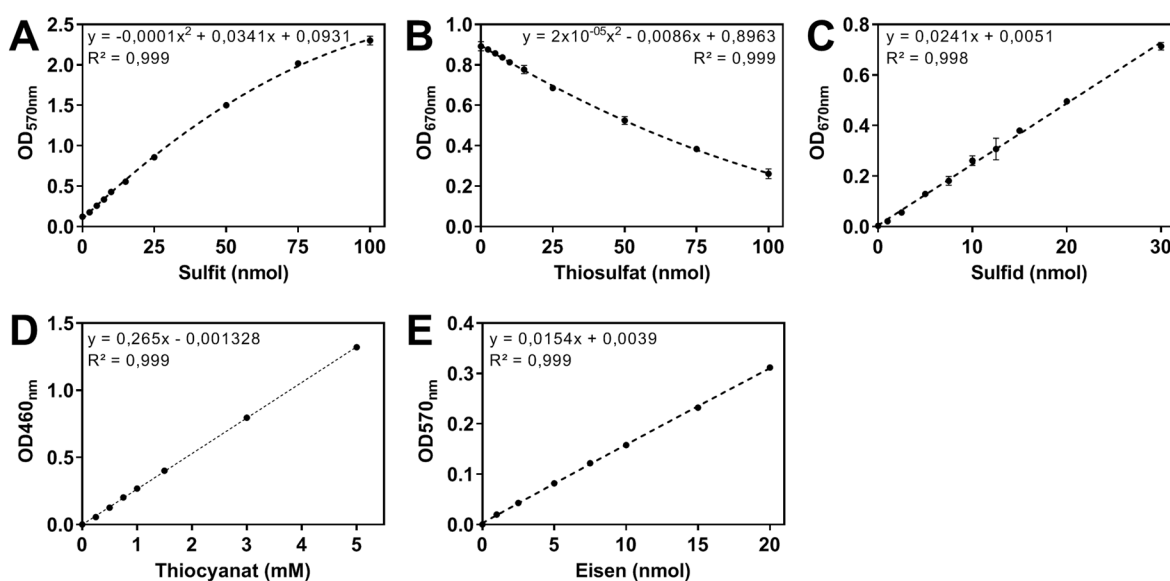
Für die Bestimmung des Eisengehalts wurden 5 – 10 nmol gereinigtes Protein in einem Volumen von 800  $\mu\text{l}$  mit 100  $\mu\text{l}$  8 M HCl ergänzt und für 10 min inkubiert. Anschließend wurden 100  $\mu\text{l}$  80% (w/v) Trichloressigsäure zugegeben und für weitere 10 min inkubiert, gefolgt von der Sedimentation des präzipitierten Proteins (13 000 x g, 10 min). 800  $\mu\text{l}$  des

Überstandes wurden in eine Halbmikroküvette überführt und dem Ansatz 250  $\mu\text{l}$  75% (w/v) Ammoniumacetat zugefügt. Die Reduktion der  $\text{Fe}^{3+}$ -Ionen erfolgte durch Zugabe von 100  $\mu\text{l}$  10% (w/v) Hydroxylamin-Hydrochlorid. Nach Zugabe von 100  $\mu\text{l}$  TPTZ-Lösung wurde die  $\text{OD}_{593}$  gegen den Reagenzienleerwert gemessen. Die Kalibration erfolgte anhand einer mit Eisen-(II)-Sulfat erstellten Eichgeraden (Abb. 2.3 E).

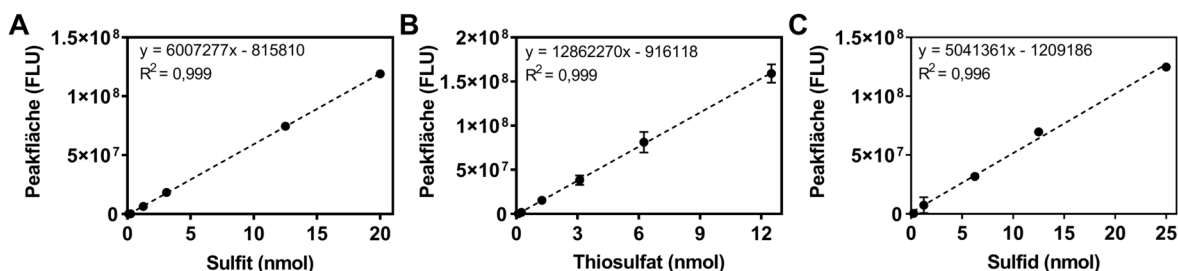
### 2.10.14 HPLC-Analysen

Neben dem kolorimetrischen Nachweis von Reaktionsprodukten der SORs wurden diese mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) analysiert. Hierzu wurde, ausgehend von der Studie von Rethmeier *et al.* (1997), eine Methode zur Enzymtest-gekoppelten Detektion reduzierter Schwefelverbindungen entwickelt.

Für die Analyse von Schwefelverbindungen direkt aus dem Enzymtestansatz wurde der elementare Schwefel, nach entsprechender Enzymreaktion, zunächst sedimentiert (13 000 x g, 1 min) und 100  $\mu\text{l}$  des Überstan-



**Abbildung 2.3** | Kalibrationskurven der kolorimetrischen Nachweisreaktionen von Schwefelverbindungen und Eisen. **A**, Polynomiale Anpassung der Sulfid-Kalibration. **B**, Polynomiale Anpassung der Thiosulfat-Kalibration. **C**, Lineare Anpassung der Sulfid-Kalibration. **D**, Lineare Anpassung der Thiocyanat-Kalibration. **E**, Lineare Anpassung der Eisen-Kalibration. Alle Messungen wurden in Triplikaten durchgeführt, die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichungen.



**Abbildung 2.4** | Kalibrationskurven der HPLC-basierten Quantifizierung von Schwefelverbindungen nach mBBR-Derivatisierung. **A**, Lineare Anpassung der Sulfid-Kalibration. **B**, Lineare Anpassung der Thiosulfat-Kalibration. **C**, Lineare Anpassung der Sulfid-Kalibration.

des in 100  $\mu\text{l}$  H<sub>2</sub>O (HPLC-Qualität), 50  $\mu\text{l}$  HE-PES-Puffer (pH 8,0) und 50  $\mu\text{l}$  Methanol (HPLC-Qualität) überführt. Dem Ansatz wurden 10  $\mu\text{l}$  Monobrombiman (mBBR) zugegeben. Die Derivatisierung erfolgte im Dunkeln und wurde nach 30 min durch Zugabe von 100  $\mu\text{l}$  65 mM Methansulfonsäure gestoppt.

Analysen der derivatisierten Schwefelverbindungen erfolgten in einem *Hitachi LaChrom Elite* HPLC-System (Hitachi High Technologies America, Inc., Schaumburg, USA), verbunden mit einem Fluoreszenz-Detektor (L-2485) bei einer Anregung von 380 nm und einer Emission von 480 nm. Die Trennungen wurden auf einer Umkehrphasensäule *LiChrospher 60, RP selectB* (Merck, Darmstadt) durchgeführt, welche auf 40 °C erhitzt wurde. Die Flussrate betrug 1 ml/min.

Zur Elution wurde ein Laufmittelgemisch aus 100 % Methanol (A) und 0,25 % Essigsäure, pH 4 (B) gewählt und wie folgt eluiert:

0-10 min	10 % A, 90 % B; isokratisch
10-17 min	90-70 % B; linearer Gradient
17-22 min	30 % A; 70 % B; isokratisch
22-70 min	50 % B; linearer Gradient
70-75 min	100 % A, 0 % B; isokratisch
75-90 min	10 % A, 90 % B; isokratisch

Kalibrationskurven wurden mit Natriumthiosulfat-, Natriumsulfit- und Ammoniumsulfid-Standardlösungen durchgeführt, wobei die integrierte Peakfläche gegen definierte Stoffmengen aufgetragen wurde (Abb. 2.4).

### 2.10.15 Massenspektrometrie (MS)

Für die massenspektrometrischen (MS) Analysen von Schwefelverbindungen wurde ein Massenspektrometer verwendet (*Impact II, Quadrupole-time-of-flight*, Bruker Daltonik), welches mit einer Elektrospray-Ionenquelle ausgestattet worden war, die im positiven Ionenmodus bei 180 °C Quelltemperatur betrieben wurde. Die Kapillarspannung wurde auf 3 kV mit einem Zerstäubungsdruck von 0,4 bar und einem Stickstoffstrom mit einem Durchfluss von 4 l/min eingestellt.

Holoprotein-Analysen der AcPDO bzw. des hETHE1 wurden ebenfalls mit Elektrospray-Ionisation (ESI) und MALDI-TOF MS direkt aus der Lösung durchgeführt. 20  $\mu\text{g}$  frisch isolierte AcPDO wurden für 1 min in einem Endvolumen von 100  $\mu\text{l}$  Enzymtestpuffer wie folgt inkubiert: (1) wie isoliert, (2) mit 1 mM GSH oder (3) mit 1 mM GSSH. Vor der Analyse wurden die Proben mit einer C4 HPLC-Säule und einem Lösungsmittelgemisch aus H<sub>2</sub>O mit 0,01 % Trifluoressigsäure (TFA) für 3 min aufgetrennt, gefolgt von einem linearen Gradient zu 100 % Acetonitril mit 0,01 % TFA. Das Massenspektrometer wurde mit einer Elektrospray-Ionenquelle im positiven Ionisierungsmodus verwendet. Der gewählte Massebereich lag zwischen 800 und 5 000 m/z. Stickstoff wurde als Trägergas verwendet und die Temperatur auf 220 °C mit einem Zerstäubungsdruck von 1,8 bar, einem Durchfluss von 8 l/min und einer Kapillarspannung von 4,5 kV gesetzt. MALDI TOF MS-Analysen von

Holoenzymen wurden mit einem *Autoflex speed* TOF/TOF Spektrometer (Bruker Daltonik) mit einer 2,5-Dihydroxyacetophenon-(DHAP) Matrix durchgeführt.

MALDI TOF MS Analysen Trypsin-gespaltener Peptidfragmente wurden an der MS-Abteilung der Universität Hohenheim durchgeführt. In einem ersten Ansatz wurden hierfür 20 µg der AcPDO-Proben mit 5 mM Iodacetamid (IAA) für 45 min im Dunkeln inkubiert und anschließend mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Die Proben wurden hierfür sowohl mit als auch ohne DTT als Reduktionsmittel im SDS-Probenauftragspuffer versetzt. Als Kontrolle diente ein Ansatz der AcPDO, die nicht mit IAA vor dem Probenauftrag behandelt wurde.

Für die Bestimmung von Proteinmodifikationen aus Trypsin-gespaltener AcPDO wurden 10 µg der AcPDO-Proben für 1 min im Enzymtestpuffer mit (1) 1 mM GSH, (2) 2 % (w/v) elementarer Schwefel, (3) 1 mM GSH und 2 % (w/v) elementarer Schwefel und (4) 1 mM GSSH (hergestellt nach Methode 1; GSSH-Synthese) bei 40 °C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 15 mM *N*-Ethylmaleinimid (NEM) im Falle der Proben mit elementarem Schwefel und 5 mM NEM für Proben ohne elementaren Schwefel gestoppt. Es folgte eine Auftrennung der Proteine mittels SDS-PAGE, wobei SDS-Probenauftragspuffer mit und ohne DTT als Reduktionsmittel verwendet wurde. Die Gele wurden mittels kolloidalen Coomassie-Lösung gefärbt, die AcPDO-Banden herausgeschnitten und für die tryptische Spaltung und MS Analysen versendet (*Mass Spectrometry Unit*, Universität Hohenheim). Alle MS/MS Proben wurden mittels Mascot (Matrix Science, London, UK; Version 2.6.1) analysiert. Peptidfragmente wurden mit einer Massentoleranz von 0,6 kDa und einer Ionentoleranz von 5,0 ppm gesucht. Zur Validierung der MS/MS basierten identifizierten Peptide wurde Scaffold (Version Scaffold\_4.8.6, Proteome Software Inc., Portland, OR) genutzt. Die identifizierten Peptide

wurden berücksichtigt, wenn sie einen Grenzwert von über 90 % mit anschließender delta-Massenkorrektur im *Peptid-Prophet* Algorithmus besaßen (Keller *et al.*, 2002). Proteine wurden für weitere Analysen berücksichtigt, wenn sie mit einer Wahrscheinlichkeit von mehr als 95 % festgestellt wurden und mindestens ein identifiziertes Peptid enthielten. Die Proteinwahrscheinlichkeiten wurden mittels des *Protein-Prophet* Algorithmus zugeordnet (Nesvizhskii *et al.*, 2003). Die resultierenden Massenspektren wurden mittels des Programms SCAFFOLD 4 analysiert (Searle, 2010).

#### 2.10.16 SWATH-LC/MS/MS

Proteomdaten aus *Tv. paradoxus* wurden mittels SWATH (*Sequential Window Acquisition of all Theoretical Fragment Ion Spectra*) Massenspektrometrie erhoben (Gillet *et al.*, 2012, Losensky *et al.*, 2017).

Hierfür wurden *Tv. paradoxus*-Kulturen auf einen Proteingehalt von  $5 \times 10^{-4}$  mg/ml eingestellt. Jeweils 50 ml Zellsuspension aus verschiedenen Wachstumsphasen wurde sedimentiert (5 000 x g, 10 min, 4 °C), in einem Volumen von 3 ml mineralischen Basismedium aufgenommen und für 2 x 5 min sonifiziert (*Branson Sonifier* 250, Stufe 5, Mikrospritze (5 mm), 50% Arbeitszyklus). Die Zelltrümmer wurden sedimentiert (5 000 x g, 10 min, 4 °C) und der Proteingehalt des Überstandes quantifiziert.

Je 50 µg Protein wurden auf 4-12 % Nu-PAGE Novex BisTris Minigelen (Invitrogen, Carlsbad, USA) aufgetragen und 1,5 cm ins Gel einlaufen gelassen, gefolgt von einer Coomassie-Färbung. Proteinbereiche im Gel wurden ausgeschnitten, zerkleinert, mit DTT reduziert und mit IAA alkyliert, gefolgt von einer Trypsin-Spaltung über Nacht. Trypsin-gespaltene Peptide wurden aus dem Gel extrahiert und die Lösung in einer Vakuumzentrifuge getrocknet. Die Lagerung erfolgte bei -20 °C (Atanassov & Urlaub, 2013).

Zur Erstellung einer sequenzannotierten Spektrenbibliothek wurden Aliquots zu einer Gesamtmenge von 80 µg gepoolt und mittels einer *reversed phase spin column* (Pierce High pH Reversed-Phase Peptide Fractionation Kit, Thermo Fisher Scientific Inc.) fraktioniert. Zur Kalibrierung der Retentionszeit wurden sowohl die Fraktionen als auch die zur Quantifizierung verwendeten Einzelproben mit einem synthetischen Peptidstandard (iRT Standard, Biognosys) versetzt.

Die Peptidproben wurden mittels Nanofluss-Chromatographie (Eksigent nanoLC425) gekoppelt an ein hybrides Quadrupol-Flugzeit Massenspektrometer (TripleTOF 5600+, Sciex) mit einer Nanospray III Ionenquelle (Emitter-Spannung 2400 V, Interface-Temperatur 150 °C, Sheathgas-Einstellung: 12) analysiert. Die Analysen wurden mittels Analyst TF 1.7.1 Software (Sciex) gesteuert. Hierfür wurden die Proteine in einer Konzentration von 0,3 mg/ml in Ladepuffer (2 % Acetonitril, 0,1 % Ameisensäure) gelöst und 1,5 µg auf einer Vorsäule (0,18 mm ID x 20 mm, Symmetry C18, 5 µm, Waters, Milford, USA) konzentriert. Die Trennung der Fragmente erfolgte auf einer analytischen RP-C18-Säule (0,075 mm ID x 250 mm, HSS T3, 1,8 µm, Waters, Milford, USA) mittels eines 90-minütigen linearen Gradienten (5-35 % Acetonitril/ 0,1 % Ameisensäure) bei einer Flussrate von 300 nl/min.

Qualitative LC/MS/MS-Analysen wurden mittels datenabhängiger Erfassung (*Data Dependent Acquisition*, DDA) mit einer Top 25 Methode durchgeführt. Peptidprecursor wurden mittels MS für 350 ms in einem Bereich von 350 – 1 250 m/z bei einer Masseauflösung von 30 000 FWHM (*Full Width Half Maximum*) detektiert. Bis zu 25 mehrfach geladene Vorläufer je Zyklus wurden durch *Collision Induced Dissociation* (CID) fragmentiert und für je 100 ms deren Fragmente im Bereich 180 – 1 600 m/z bei einer Auflösung von 17 000 FWHM detektiert. Bereits fragmentierte Vorläufer wurden für 30 s ausgeschlossen. Für die Erstellung einer Sequenzdaten-

bank wurden je vier Replikate pro *Reversed-Phase*-Fraktion akquiriert.

Für die quantitativen SWATH-Analysen wurden MS/MS-Daten mittels SWATH-MS mit 65 Fenstern variabler Größe im Vorläuferbereich von 400 – 1 050 m/z erhoben. Peptidfenster wurden mittels *rolling conversion energy* CID fragmentiert und die Fragmente im Bereich 350 – 1 400 m/z für jeweils 40 ms pro Fenster erfasst. Zwei technische Replikate je biologische Probe wurden gemessen.

Die Proteinidentifizierung erfolgte mittels der *ProteinPilot* Software V 5.0 4769 (Sciex). 220 269 MS/MS Spektren aus der kombinierten qualitativen Analyse wurden mit dem UniProtKB *Thioalkalivibrio paradoxus* Referenzproteom (Version 03/19, 3 398 Sequenzen zuzüglich 52 bekannte Laborkontaminanten) verglichen.

Die Erstellung einer Spektralbibliothek und die *SWATH-Peak*-Extraktion erfolgten mit der *PeakView* Software V 2.1 (Sciex) und der *SWATH-Quantifizierungs-microApp* V 2.0.

Die Ergebnisse der Proteinidentifikation wurden mittels *Gene Ontology* (GO) und KEGG-Anpassung mit dem *DAVID Functional Annotation Tool* v. 6.8 ausgewertet (Kanehisa & Goto, 2000, Huang da *et al.*, 2009a, Huang da *et al.*, 2009b).

Die Proteomdaten der Massenspektrometrie wurden über das PRIDE-Partnernetzwerk (Perez-Riverol *et al.*, 2019) beim *ProteomeXchange* Konsortium mit der Datensatzerkennung PXD015248 hinterlegt.

### Statistische Analysen

Statistische Analysen wurden mit dem Programm R (Version 3.5.4) durchgeführt. Die Varianzstabilisierung der Rohdaten erfolgte mit Hilfe der rlog-Transformation (Love *et al.*, 2014). Für den Test der Separabilität der Datensätze wurde eine Hauptkomponentenanalyse (*principal component analysis*, PCA) durchgeführt. Die differentiell produzierten Proteine wurden mit Hilfe des DESeq2-Paketes ermittelt, wobei die resultierenden *p-values* gegen eine Falscherkennungsrate von 5 %

adjustiert wurden (Benjamini & Hochberg, 1995). Die funktionalen Charakterisierungen und das *metabolic pathway mapping* erfolgten basierend auf der *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes* Datenbank<sup>2</sup> und wurden mit dem R-Paket *pathview* erstellt (Luo & Brouwer, 2013). *Volcano plots* wurden anhand der jeweiligen Veränderungen der relativen Häufigkeit bezogen auf den ersten Zeitpunkt der Probenentnahme in Korrelation mit den errechneten *p-values* erstellt.

### 2.10.17 Inhibitionsstudien

Inhibitionsstudien der AcPDO wurden mit NEM und IAA durchgeführt, wobei verschiedene Ansätze verfolgt wurden.

Zum einen wurden, um die Ergebnisse von Wang *et al.* (2014) zu verifizieren, IAA und NEM in ihrer finalen Konzentration direkt in den Enzymtestpuffer gegeben, da es in dieser Studie unklar blieb ob die modifizierenden Agenzien an die Cystein-Reste von GSH bzw. GSSH binden, an die des Proteins oder beides.

In einem anderen Ansatz wurden ca. 5 mg/ml AcPDO für 20 min mit 3 mM NEM bzw. 5 mM IAA inkubiert und anschließend für 24 h gegen 50 mM Tris/HCl-Puffer, pH 7,5 dialysiert (Dialysevolumen: 2 x 300 ml; 1 x 400 ml). Direkt im Anschluss wurde die Enzymaktivität gemessen.

Die selektive Reduktion putativer Disulfidbrücken wurde mit Tris(2-carboxyethyl)phosphin (TCEP) in einer Anaerobenkammer (Coy, <0,5 ppm O<sub>2</sub>) durchgeführt um sofortige Reoxidation zu verhindern. 5 mg gereinigtes Enzym wurden dialysiert um Desthio-biotin der Proteinreinigung aus dem Elutionspuffer zu entfernen und anschließend erneut auf eine Strep-Tactin *Superflow* Tropfsäule aufgetragen. Vor Elution des Proteins wurden 3 ml einer 3 mM TCEP-Lösung, gefolgt von 3 ml einer 3 mM IAA-Lösung bzw. einer 2 mM NEM-Lösung, aufgetragen und das säulengebundene Protein für 10 min mit den Agenzien

inkubiert. Anschließend wurde das auf diese Weise modifizierte Enzym mit Puffer W gewaschen und eluiert. Die Elutionsfraktionen wurden daraufhin aus der Anaerobenkammer entfernt, der Proteingehalt ermittelt und sofort Enzymaktivitätstests in Anwesenheit von Sauerstoff durchgeführt.

### 2.10.18 Proteindenaturierungsstudien

Für Proteindenaturierungs-Experimente wurde Guanidinium-Chlorid und Harnstoff in 150 mM Tris/HCl-Puffer pH 8,0 angesetzt und in den jeweiligen Endkonzentrationen mit 1 mg/ml gereinigtem Enzym für 1 h bei 25 °C inkubiert. Eine Superose 6 HR 10/30 Gelpermeationssäule wurde mit dem jeweiligen Denaturierungsmittel äquilibriert und 200 µl des Gemisches auf die Säule aufgetragen. Als Laufmittel diente das jeweilige Denaturierungsmittel in 150 mM Tris/HCl-Puffer, pH 8,0 bei einer Flussrate von 0,5 ml/min.

### 2.10.19 Proteinstabilitäts-Messungen

Proteinstabilitätsmessungen wurden mittels *Thermal Shift Assays* (*Differential Scanning Fluorimetry*, DSF) durchgeführt. Das Verfahren beruht auf den Anstieg der intrinsischen Tryptophan/Tyrosin-Fluoreszenz während der temperaturabhängigen Entfaltung des Proteins. Die nanoDSF-Messungen wurden im Prometheus NT.48 (NanoTemper Technologies GmbH, München) in Standard-Glaskapillaren durchgeführt. Das Fluoreszenzverhältnis von 330/350 nm wurde konstant bei einer Heizrate von 1 °C/min gemessen. Die Schmelzpunkte (*T<sub>M</sub>*) wurden anhand der ersten Ableitung der resultierenden Schmelzkurven ermittelt. Die Proteinkonzentration betrug in Standardexperimenten 1 mg/ml in 100 mM Tris/HCl-Puffer, pH 8,0 mit 150 mM NaCl.

<sup>2</sup> <https://www.genome.jp/kegg/>



### 2.10.20 Bestimmung von Bindungskonstanten

Affinitätsmessungen wurden mittels *MicroScale Thermophoresis* (MST) durchgeführt. Das Verfahren basiert auf der Bewegung von Molekülen entlang eines Temperaturgradienten, induziert durch einen Infrarot-Laser. Dies kann durch kovalent an das Protein gebundene Fluorophore detektiert werden.

Ca. 125  $\mu\text{M}$  gereinigtes Protein wurden hierfür mit dreifachen molaren Überschuss des Fluorophors nach Angaben des Herstellers markiert (*Protein Labeling Kit RED – NHS*, NanoTemper Technologies GmbH, München). Verdünnungsreihen des jeweiligen Liganden wurden in 70 mM Tris/HCl-Puffer, pH 7,5 mit 0,05 % (v/v) Tween 20 erstellt. Die Messungen wurden mit 20 nM AcPDO in einem Monolith NT.115, entweder in Standard- oder in Premium-beschichteten Kapillaren bei 40 °C durchgeführt. Die Anregungsleistungen betrugen 40-80 %, die MST-Leistungen zwischen 40 und 60 %.

## 2.11 Spektroskopische Methoden

### 2.11.1 UV-Vis Spektroskopie

Absorptionsmessungen und UV-Vis-Spektren wurden in einem Spektralphotometer (Evolution 220, Thermo Scientific, Dreieich) aufgenommen. Messungen der Absorption erfolgten bei Raumtemperatur mit einer Bandbreite von 1 nm und einer Integrationszeit von 0,05 s. UV-Vis-Spektren wurden mit einer Bandbreite von 1 nm, einer Integrationszeit von 0,05 s einem Datenintervall von 1 nm und einer Scangeschwindigkeit von 1 200 nm/min aufgenommen.

### 2.11.2 CD Spektroskopie

Circulardichroismus (CD)-Spektren der TpSOR wurden in einem J-810 Spectropolarimeter (JASCO North America, Easton, USA)

im Fern-UV-Bereich zwischen 190 und 260 nm aufgenommen. Gewählt wurden Messintervalle von 0,5 nm mit einer Bandweite von 1 nm, einer Antwortzeit von 1 s und einer Messgeschwindigkeit von 50 nm/min. Die Messungen erfolgten in Quarzküvetten mit einer Schichtdicke von 0,1 cm, wobei jeweils zehn Messungen pro Datensatz akkumuliert wurden. Für die Analysen wurde gereinigtes Protein gegen 20 mM Tris/HCl-Puffer, pH 7,5 dialysiert und 0,1 mg/ml Protein für die Messung eingesetzt. Die Spektren wurden anschließend gegen das Spektrum der Pufferlösung korrigiert. Aus der ermittelten Elliptizität  $\theta$  wurde die mittlere molare Elliptizität pro Aminosäurerest  $[\theta]_{\text{MRW}}$  berechnet (Gl. VIII).

$$\text{VIII: } [\theta]_{\text{MRW}} = (\theta \times M) * (10 \times c \times d \times n)^{-1}$$

$[\theta]_{\text{MRW}}$ : Mittlere molare Elliptizität ( $\text{deg cm}^2 \text{dmol}^{-1}$ )  
 $\theta$ : Gemessene Elliptizität (deg)  
 M: Molekulargewicht (g/mol)  
 c: Proteinkonzentration (mg/ml)  
 d: Schichtdicke der Küvette (cm)  
 n: Anzahl der Aminosäuren

Die Dekonvolutierung der Daten erfolgte mit der CDNN Software.

### 2.11.3 Stopped-Flow Spektroskopie

*Stopped-Flow* Kinetiken wurden mit einem HI-TECH SF-61 DX2 *Stopped Flow* Spektrometer (TgK Scientific Ltd., Bradford-on-Avon, UK) bei 25 °C ( $\pm 0,2$  °C) durchgeführt.

Um die Sauerstoff-abhängige Reaktion der AcPDO zu verfolgen wurden 0,6 mM gereinigte AcPDO anaerobisiert und unter Ausschluss von Sauerstoff mit 12 mM GSSH vorinkubiert. Die inerte AcPDO-GSSH-Lösung wurde anschließend in einem 1:1 Verhältnis mit sauerstoffgesättigtem 70 mM Tris/HCl-Puffer pH 7,5 gemischt und die Reaktion im *Stopped Flow* System, gekoppelt an einen Dioden-Array-Detektor (TIDAS S, J&M Analytik, Essingen), visualisiert. Die Spektren wurden in 20 s Intervallen über einen Zeitraum von 60 min in einem Wellenlängenbereich zwischen 300 und 800 nm aufgenommen. Das

GSSH-Spektrum diene als Referenz und wurde von den aufgenommenen Spektren subtrahiert und die Spektren Basislinien-korrigiert.

In einem zweiten Ansatz wurde die Reaktion von GSSH mit sauerstoffgesättigter AcPDO („wie isoliert“) gemessen. Hierfür wurde 3 mM anaerobes GSSH mit aerober AcPDO ohne Vorinkubation im *Stopped Flow* System gemischt. Die Messung verlief wie oben beschrieben normiert auf das GSSH-Grundspektrum.

#### 2.11.4 EPR Spektroskopie

Mit der Elektronenspinresonanz-Spektroskopie (*electron paramagnetic resonance*, EPR) wurden Atome mit ungepaarten (paramagnetischen) Elektronen detektiert.

Hierfür wurden gereinigte Proteine in *Macrosep Advance Centrifugal Devices 30 K MWCO* (Pall Corporation, New York, USA) mit dem 50-fachen Volumen 50 mM Tris/HCl-Puffer (pH 8,5 für die *TpSOR*; pH 7,5 für die *AcPDO*) gewaschen und der Eisengehalt quantifiziert. Proteinlösungen mit einer Eisenkonzentration von mindestens 100  $\mu\text{M}$  wurde daraufhin in den EPR-Messungen eingesetzt.

Für die EPR-verfolgten Redox titrationen wurden die Proteine anaerobisiert und mit Glukose-Oxidase (280 nM aus *Aspergillus niger*), Katalase (640 nM aus Rinderleber) und Glucose (1 mM) versetzt um verbliebenen Restsauerstoff aus der Lösung abzufangen. Die Reduktion der Eisenzentren wurde anaerob mit einer 40 mM Dithionit-Lösung unter einem kontinuierlichen Argon-Strom durchgeführt. Folgende Redox-Mediatoren (jeder 40  $\mu\text{M}$ ) wurden dem Gemisch hinzugefügt ( $E^\circ$  in Klammern angegeben): 1,2-Napht-hochinon-4-sulfonsäure (+215 mV), Trime-thylhydrochinon (+115 mV), 1,4 Naphthochinon (+60 mV), Phenazin-Ethosulfat (+ 55 mV), Menadion (0 mV), Plumbagin (-40 mV), Indigotrisulfonat (-70 mV), 2-Hydroxy-1,4-naphthochinon (-152 mV), Anthrachinon-2-

sulfonat (-225 mV), Safranin (-280 mV), Neutralrot (-325 mV), Benzylviologen (-359 mV; alle Redox-Mediatoren von Sigma-Aldrich). Die Elektroden wurden mit einer Chin-hydron-gesättigten Lösung bei pH 7,0 kalibriert. Die EPR-Proben wurden beim Erreichen der gewünschten Potentiale entnommen und in flüssigem Stickstoff gefroren. Die EPR-Messungen wurden in einem Bruker ESP380 Spektrometer (Bruker, Billerica, USA), welches an einem ESR900 Helium Durchfluss Kryostat gekoppelt war, bei 5,0 K durchgeführt. Redox-Potentiale wurden gegen das Potential einer Standard-Wasserstoffelektrode normiert und die EPR-Daten an eine Nernst-Gleichung für eine Ein-Elektronen-Übertragung angepasst.

Für Vergleiche des Oxidationszustandes des katalytischen Eisens vor und nach Inkubation mit dem jeweiligen Substrat wurden EPR-Messungen der nativen *TpSOR* durchgeführt, elementarer Schwefel direkt in das EPR-Röhrchen gegeben, für 5 min bei 80 °C inkubiert und anschließend die EPR-Messung wiederholt. Für die *AcPDO* erfolgte die Inkubation mit GSSH bei 40 °C für 5 min.

## 2.12 Methoden zur Strukturbestimmung

### 2.12.1 Kristallisation der *TpSOR* und der *AcPDO*

Heterolog gereinigte *TpSOR* und *AcPDO* wurden zunächst in 50-fachen Volumen 50 mM Tris/HCl-Puffer (pH 8,5 für die *TpSOR*; pH 7,5 für die *AcPDO*) in *Macrosep Advance Centrifugal Devices 30 K MWCO* (Pall Corporation, New York, USA) gewaschen und konzentriert. 18,4 mg/ml *TpSOR* bzw. 11,8 mg/ml *AcPDO* wurden im Folgenden für Kristallisationsexperimente genutzt.

Erste *sitting-drop* Dampfdiffusions-Kristallisationsversuche wurden mit den *Screening Kits Structure Screen 1+2 HAT-96* und *JCSG-plus HAT-96/FX-96* für lösliche Proteine (beide Molecular Dimensions Limited, Suf-

**Tabelle 2.7** | Kristallisationsbedingungen und kryoprotektive Lösungen der *TpSOR* und der *AcPDO*.

Protein	Kristallisationsbedingung	Temperatur	Verhältnis <sup>1</sup>	Kryoprotektive Lösung
<i>TpSOR</i>	0,9 M Na-Acetat	293 K	2:1	Kristallisationslösung mit 25% [w/v] Glycerin
	0,1 M Na-Kakodylat, pH 6,5			
<i>AcPDO</i>	0,1 M DL-Äpfelsäure, pH 7,0	293 K	1:1	Kristallisationslösung mit 20% [w/v] Glycerin
	12 % [w/v] PEG 3350 20 mM Hexaammin-Cobalt-(III)-Clorid			

<sup>1</sup> Verhältnis zwischen Protein- und Kristallisations-Lösung.

folk, UK) bei 295 K mit einem *Mosquito* Kristallisationsroboter (TTP Labtech, Cambridge, UK) in 0,2  $\mu$ l Tropfen mit 96 verschiedenen Bedingungen in 96-Well-Platten durchgeführt. Hierbei wurden unterschiedliche Protein: Kristallisationslösungs-Verhältnisse (2:1, 1:1, 1:2), gegen 30  $\mu$ l Kristallisationslösung äquilibriert. Sofern Kristallbildung mikroskopisch beobachtet wurde, sind bei den vielversprechendsten Kristallisationsbedingungen die Puffer-Konzentrationen, die Konzentrationen des Fällmittels, der pH, die Salzkonzentration, die Inkubationstemperatur und das Verhältnis von Protein: Kristallisationslösung angepasst worden. Weitere Proteinkristallverbesserungen wurden mittels *hanging-drop* Dampfdiffusion in einem Gesamtvolumen von 2  $\mu$ l, äquilibriert gegen 500  $\mu$ l Kristallisationslösung, in 24-Well-Platten durchgeführt. Der Kristallisationsprozess der *AcPDO* wurde zudem in Anwesenheit von Additiven (*Additive Screen HR2-428 Reagent Formulation*, Hampton Research, Aliso Viejo, USA) durchgeführt. Proteinkristalle in gewünschter Größe und Morphologie wurden in kryoprotektive Lösungen (Tab. 2.7) überführt (McFerrin & Snell, 2002) und in flüssigen Stickstoff gefroren. *Soaking* der Proteinkristalle wurde in Anwesenheit von je 20 mM GSH/GSSH entweder zuvor oder direkt in kryoprotektiver Lösung für 1 h bei 278 K durchgeführt.

### 2.12.2 Datensammlung und Prozessierung von Röntgenstrukturdaten

Die Röntgenstrahlen-Diffraktionsmessungen wurden unter einem Stickstoffstrom bei

100 K durchgeführt. *TpSOR*-Datensätze wurden am *Diamond Light Source* mit der Strahlenquelle I03 (Oxfordshire, UK), an der *European Synchrotron Radiation Facility* mit der Strahlenquelle ESRF ID30A-1 (Grenoble, Frankreich) und am *Barcelona Synchrotron Park* mit der Strahlenquelle XALOC (Alba, Spanien) gesammelt. *AcPDO*-Datensätze wurden an der *European Synchrotron Radiation Facility* mit der Strahlenquelle ESRF ID30A-1 (Grenoble, Frankreich) und am *Diamond Light Source* mit der Strahlenquelle I24 (Oxfordshire, UK) gesammelt.

Alle Datensätze wurden mit der XDS-Suite prozessiert (Kabsch, 2010).

### 2.12.3 Kristallstrukturbestimmung

Sowohl die *TpSOR*- als auch die *AcPDO*-Struktur wurden mit Hilfe der MoRDa-Software (Vagin & Lebedev, 2015) bestimmt. Das Phasenproblem wurde für die *TpSOR* mit dem *AaSOR*-Modell (Urich *et al.*, 2005a), für die *AcPDO* mit dem *MxPDO*-Modell (Sattler *et al.*, 2015) durch *molecular replacement* mit PHASER (McCoy *et al.*, 2007) gelöst. Die initialen Strukturen wurden mit *AutoBuild* aus der PHENIX-Suite (Terwilliger *et al.*, 2008, Adams *et al.*, 2010) verbessert und anschließend manuell an die  $\sigma_A$  *Fourrier electron density maps* (Read, 1986) mittels des Programms COOT angepasst (Emsley *et al.*, 2010). Alle gemessenen *AcPDO* Kristalle hatten die Raumgruppe  $P 4_1 4_1 2$ , weshalb das PHENIX.REFINE *multizone rigid body*-Protokoll (Afonine *et al.*, 2009) genutzt wurde um die vorhandenen Modell-Koordinaten jedes neu erhobenen Da-

tensatzes anzupassen und die Struktur sukzessive zu verbessern. Das *Refinement* der Atompositionen, der Atomverschiebungsparameter und die automatische Ergänzung von Wassermolekülen erfolgte mit PHENIX.RE-FINE (Afonine *et al.*, 2012).

#### 2.12.4 EM Probenvorbereitung

Heterolog produzierte SORs wurden gereinigt, der Puffer ausgetauscht und anschließend für Kryo-EM-Analysen verwendet. Hierfür wurden löchrige Kohlenstoffgitter (Quantifoil R2/2) für 2 h mit Chloroform inkubiert und anschließend glimmend entladen. Im Folgenden wurden diese mit 3  $\mu$ l der SOR-Präparationen mit einer Konzentration von 1,5 mg/ml in 50 mM Tris/HCl, pH 8,0 beladen und in flüssigen Ethan in einem Vitrobot Mark IV (FEI) bei 10 °C und 70 % Luftfeuchtigkeit tauchgekühlt, nachdem sie 11 s lang geblottet wurden.

#### 2.12.5 EM Datensammlung

Kryo-EM-Daten wurden auf einem FEI Titan Krios mit 300 kV und einem Falcon III Direktelktronendetektor im Zählmodus gesammelt. 35 *Frame Videos* mit einer Gesamtdosis von 31  $e^-/\text{\AA}^2$  wurden automatisch mit EPU bei einer Nominalvergrößerung von 96 000 x und einer kalibrierten Pixelgröße von 0,827  $\text{\AA}$  aufgenommen.

#### 2.12.6 Bildverarbeitung

Die Videobilder wurden mit *MotionCor2* (Zheng *et al.*, 2017) ausgerichtet und die Kontrastübertragungsfunktion der Bilder mit Gctf (Zhang, 2016) bestimmt. Die Partikelauswahl erfolgte mit dem Autopick-Modul (Scheres, 2015) in *Relion-3* (Zivanov *et al.*, 2018). 2D-Klassifizierung und 3D-Autoverfeinerung wurden mit *Relion-3 beta* durchgeführt, gefolgt von CTF-*Refinement* und Bayesschen Polieren (Zivanov *et al.*, 2018). Das in *Relion* im-

plementierte Nachbearbeitungsverfahren (Chen *et al.*, 2013) wurde auf die endgültigen Elektronendichtekarten zur Schärfung des B-Faktors und zur Validierung der Auflösung angewendet.

SOR-Kristallstrukturen wurden anschließend an die Elektronendichtekarten in COOT (Emsley & Cowtan, 2004) ausgerichtet und manuell angepasst, gefolgt von einer Realraumverfeinerung in PHENIX (Adams *et al.*, 2010, Afonine *et al.*, 2018). Die Modellvalidierung erfolgte mit MolProbity (Chen *et al.*, 2010).

#### 2.12.7 Strukturmodell-Analyse

**Ramachandran-Analysen** wurden mittels des MolProbity-Servers<sup>3</sup> der Duke-Universität (Durham, USA) erstellt (Chen *et al.*, 2010).

Berechnungen der **elektrostatischen Oberflächenpotentiale** wurden mit Hilfe der *Adaptive Poisson-Boltzmann Solver* (APBS) Software durchgeführt (Baker *et al.*, 2001). Für die Berechnungen wurde ein maximaler Ionenradius von 2  $\text{\AA}$  mit einer Ionenkonzentration von 0,15 M, einer Protein-Dielektrizitätskonstante von 2,0, einer Lösemittel-Dielektrizitätskonstante von 78,0, einem Probenradius von 1,4  $\text{\AA}$  und einer Temperatur von 310,0 K gewählt.

Die Berechnung der **Hydrophobizität** erfolgte mittels des *color\_h* Skripts in PyMOL (Schrödinger, 2015) basierend auf der Hydrophobizitätsskala von Eisenberg *et al.* (1984).

**Liganden-Docking** wurde mittels der *Glide* Software im *extra precision* Modus (XP-Mode) durchgeführt (Friesner *et al.*, 2004). Der Struktur wurden zuvor Wasserstoffatome hinzugefügt und die Struktur direkt in Glide energieminimiert. Das Eisenatom wurde als Zentrum der Rezeptorgenerierung festgelegt.

<sup>3</sup> <http://molprobity.biochem.duke.edu/>

Berechnungen der freien Bindungsenergie ( $\Delta G$ ) erfolgten mittels Molekularmechanik kombiniert mit generalisierten Born Oberflächenbereichen (MM/GBSA; Hou *et al.* (2011)).

**Modellierung des AcPDO-GSSH Superoxid-Komplexes** wurde mittels der molekularen Modellierungs-Software Yasara durchgeführt (Krieger & Vriend, 2014, Krieger & Vriend, 2015). Hierfür wurde die AcPDO-Kristallstruktur zusammen mit der vorhergesagten GSSH-Bindungsposition aus den *Glide*-Docking-Analysen genutzt. Das Superoxid wurde in die Struktur modelliert, indem das nach Energieminimierung Axial-koordinierte Wassermolekül in ein Superoxid konvertiert wurde. Die Geometrieoptimierung des neu erstellten Strukturmodells erfolgte mit dem *Yasara Yapac* Modul unter Verwendung halbempirischer, quantenmechanischer Methoden, gefolgt von einer Energieminimierung mittels des *Yasara2*-Energiefeldes (Krieger *et al.*, 2009).

Energieminimierung des Komplexes wurde in Form einer Vollatom-Molekulardynamiksimulation (TIP3P) mit der PME-Methode durchgeführt (Essmann *et al.*, 1995). Für die Weitbereichelektrostatik wurde ein Grenzbe-  
reich von 8 Å unter physiologischen Bedingungen (0,9 % NaCl, pH 7,45) bei konstanter Temperatur (298 K) mit einem Berendsen-Thermostat und konstantem Druck (1 bar) festgelegt. Geladene Aminosäuren wurden entsprechend dem vorhergesagten pKa der Aminosäure-Seitenkette durch Ewald-Summierung zugeordnet und durch Zugabe von Gegen-Ionen (NaCl) neutralisiert (Krieger *et al.*, 2006). Energieminimierungen wurden durch simuliertes *Annealing* durchgeführt (Krieger *et al.*, 2012), einschließlich der Optimierung des Wasserstoffbrücken-Netzwerkes und der Äquilibrierung der Wasserhülle, bis

die Systemkonvergenz erreicht war ( $<0,05$  kJ/mol pro 200 Schritte).

**Tunnel- und Porenanalysen** wurden mit Hilfe der Programme *MOLE* 2.13.96 (Sehnal *et al.*, 2013) und *CAVER* 3.0.1 (Chovancova *et al.*, 2012) durchgeführt. Hierbei dienten entweder der Mittelpunkt der Holoenzyme oder das Eisenatom der einzelnen Untereinheiten als Startpunkte für die Analyse. Für *MOLE*-Analysen wurde ein *bottleneck* Radius zwischen 0,8 und 1,4 Å, eine *bottleneck* Länge zwischen 3,0 und 5,0 Å, ein Flächendeckungsradius von 5 bis 15 Å und ein minimaler Probenradius von 0,9 Å gewählt. In *CAVER*-Analysen wurde der minimale Probenradius auf bis zu 0,6 Å herabgesetzt.

**Energieminimierungen** von 3D-Strukturen wurden standardmäßig mittels Yasara durchgeführt (Krieger & Vriend, 2014, Krieger & Vriend, 2015). Hierfür wurde die kubische Simulationszelle auf einen Radius von 5 Å um alle zu berechnenden Atome erweitert und für die Simulationen das AMBER14-Kraftfeld genutzt.

**Bindungstaschen** wurden mittels des *DoGSiteScorers* (Volkamer *et al.*, 2012) des ProteinPlus-Servers der Universität Hamburg berechnet<sup>4</sup>.

**Protein-Topologie-Diagramme** wurden mit Pro-Origami<sup>5</sup> (Stivala *et al.*, 2011) erstellt und anschließend manuell nachbearbeitet.

**Helical Wheel** Darstellungen wurden mit NetWheels (Mol *et al.*, 2018) erstellt und ebenfalls manuell nachbearbeitet.

**Lokale Auflösungen** der Kryo-EM-Strukturen wurden mittels ResMap (Kucukelbir *et al.*, 2014) ermittelt.

<sup>4</sup> <https://proteinsplus.zbh.uni-hamburg.de/>

<sup>5</sup> <http://munk.cis.unimelb.edu.au/pro-origami/>

**Visualisierungen** der Proteinstrukturen erfolgten mittels PyMOL (Schrödinger, 2015) oder mit Hilfe von UCSF Chimera (Pettersen *et al.*, 2004) bzw. UCSF ChimeraX (Goddard *et al.*, 2018).

### 2.12.8 Homologie-Modellierung

3D-Modelle der *Tp*SOR und der *Ac*PDO wurden mittels der Phyre<sup>2</sup>-, I-Tasser und Swiss-Model-Server erstellt (Kelley *et al.*, 2015, Yang *et al.*, 2015, Waterhouse *et al.*, 2018). Der Phyre<sup>2</sup>-Server wurde zudem genutzt um 1:1 *threading*-Modelle mit der *Mx*PDO und der *Pp*PDO (Sattler *et al.*, 2015) als *template* zu erstellen.

---

# KAPITEL 3

## Die Persulfid Dioxygenase aus *Acidithiobacillus caldus*

---

Eine Verbindung zwischen Oberflächen-Cysteinen und dem  
enzymatischen Reaktionsmechanismus





## Einleitung

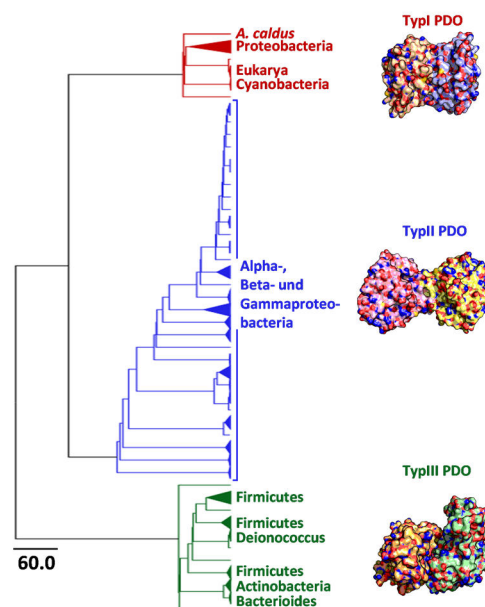
Persulfid Dioxygenasen katalysieren die Oxidation von Glutathion Persulfid (GSSH) und höheren Homologen (GSS<sub>n</sub>H;  $n > 1$ ) zu Sulfit und reduziertem Glutathion (GSH) als Reaktionsprodukte (Tiranti *et al.*, 2009, Kabil & Banerjee, 2012, Jung *et al.*, 2016). Die Aufklärung des Zusammenhangs der infantilen Stoffwechselerkrankung Ethylmalonsäure Enzephalopathie (EE) mit dem humanen *pdo* Gen bzw. dessen Genprodukt (humanes Ethylmalonsäure Enzephalopathie Protein 1; hETHE1) im Jahr 2004 (Tiranti *et al.*) führte zu einem starken Fokus der Forschung an homologen PDOs, sowohl in der Domäne der Eukaryoten als auch in Bakterien, sodass in der Folge mehrere Röntgenkristallstrukturen und biochemische Studien veröffentlicht wurden.

In diesem Zusammenhang wurde eine ETHE1-ähnliche PDO im extrem acidophilen und moderat thermophilen *Acidithiobacillus caldus* (AcPDO) identifiziert und charakterisiert (Liu *et al.*, 2014, Wang *et al.*, 2014). Das Enzym zeigte mit 2,3 U/mg Protein optimale Aktivitäten bei 45 °C und pH 8 (Anmerkung: Die Autoren haben die Aktivität mit 2 336 U/mg Protein angegeben und eine Unit als Bildung von 1 nmol Sulfit min<sup>-1</sup> definiert; in der vorliegenden Arbeit wird jedoch die klassische biochemische Definition mit 1 μmol Substrat min<sup>-1</sup> verwendet). Neben bivalenten Metallionen (Ni<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup> und Hg<sup>2+</sup>) wurde die Thiol-reaktive organische Verbindung *N*-Ethylmaleinimid (NEM) als Enzyminhibitor ermittelt.

Studien des hETHE1 zeigten zunächst, dass die PDO in Lösung ein Monomer bildet (Kabil & Banerjee, 2012). Weitere biochemische Untersuchungen im Zusammenhang mit der Aufklärung der Röntgenkristallstruktur deuteten jedoch auf ein überwiegendes Vorkommen als Homodimer hin (Pettinati *et al.*, 2015), wobei eine homotetramere Organisation der PDO von *Ar. thaliana* (ArPDO) ebenfalls beschrieben wurde (McCoy *et al.*, 2006b). Enzymkinetiken des hETHE1 ergaben eine typische

Michaelis-Menten-Kinetik mit GSSH als Substrat und einem  $K_M$  von 0,34 mM und einem  $V_{max}$  von 113 μmol min<sup>-1</sup> mg Protein<sup>-1</sup> (Kabil & Banerjee, 2012).

hETHE1 und die PDO aus *Ar. thaliana* zählen, zusammen mit vielen bakteriellen PDOs, inklusive der in dieser Arbeit untersuchten AcPDO, zu den so genannten Typ I-PDOs (Abb. 3.1). Phylogenetische Analysen zeigten, dass sich PDOs insgesamt in drei verschiedene Unterfamilien aufteilen (Liu *et al.*, 2014, Xia *et al.*, 2017). Die Typ II-PDO aus *Pseudomonas putida* ist aufgrund von zusätzliche *loops* innerhalb des Enzyms größer als die Typ I-Enzyme. Die *Staphylococcus aureus* Typ III-PDO besitzt eine C-terminale Rhodanase-Domäne, jedoch mit einer abweichenden Substratspezifität. Für dieses Enzym wurde gezeigt, dass Bacillithiol und Coenzym A-Persulfid 10- bis 20-fach höhere Spezifitätskonstanten im Vergleich zu GSSH und Cysteinpersulfid besitzen (Shen *et al.*, 2015).



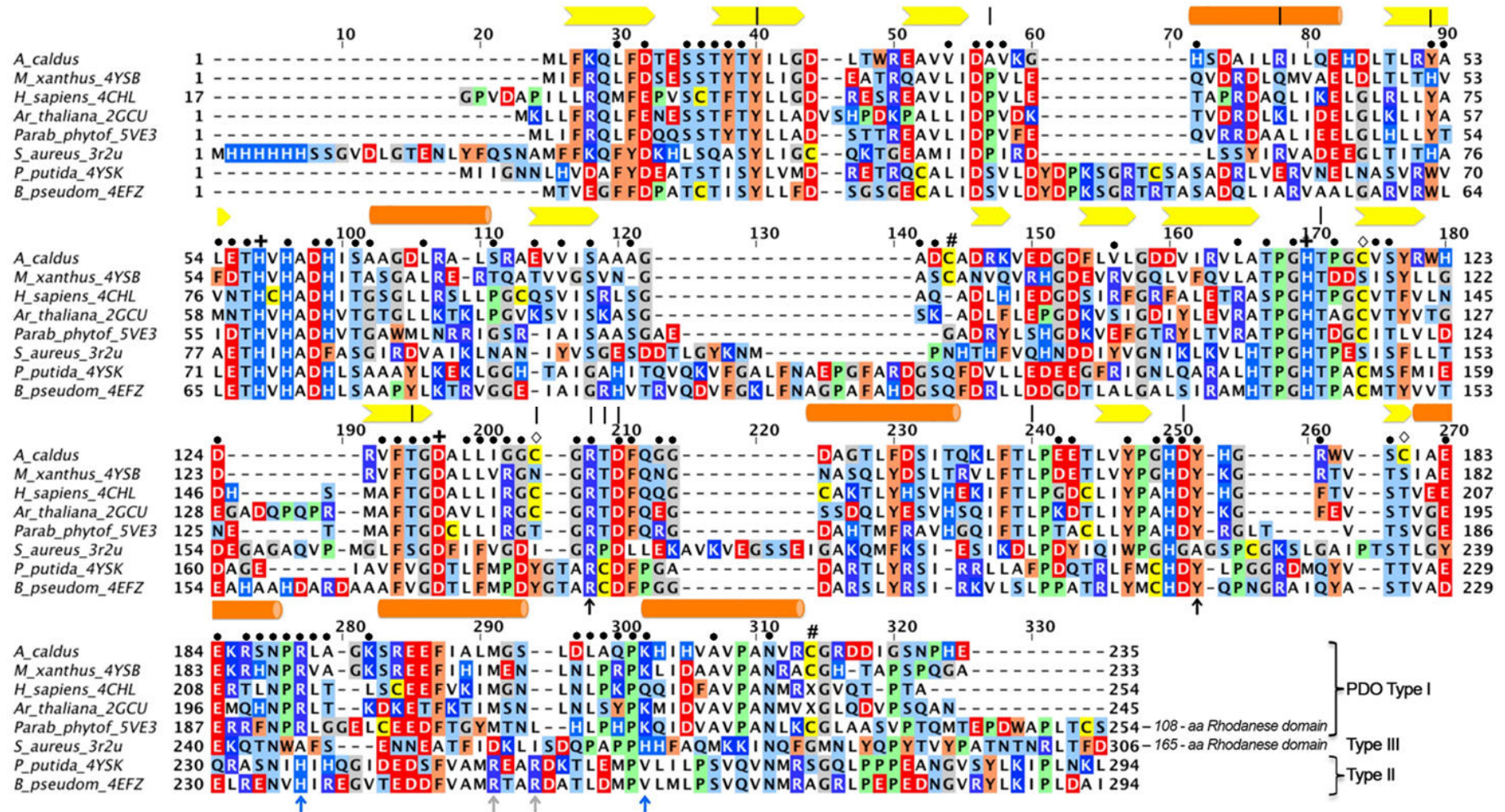
**Abbildung 3.1** | Vereinfachtes phylogenetisches Dendrogramm der PDO-Familie mit Einteilung in die drei verschiedenen Enzymtypen. Strukturen zeigen exemplarisch das Homodimer eines Vertreters des jeweiligen Typus. Typ I, hETHE1 (PDB ID: 4CHL); Typ II, *Pseudomonas putida* PDO (4YSL); Typ III, *Staphylococcus aureus* PDO (3R2U).

Analysen der hETHE1-Röntgenkristallstruktur zeigten eine doppelte Oxidation an einem Oberflächen-exponierten Cysteinrest (C<sub>247</sub>) (Pettinati *et al.*, 2015). Eine solche Modifikation als Sulfinsäure (Cys-SO<sub>2</sub><sup>-</sup>) wurde bereits in der zuvor aufgeklärten Röntgenkristallstruktur der homologen ArPDO beobachtet und als Artefakt der Proteinreinigung interpretiert (McCoy *et al.*, 2006b). In den Kristallstrukturen bakterieller PDOs ist dagegen keine Modifikation des konservierten Cysteins vorhanden (Sattler *et al.*, 2015, Motl *et al.*, 2017). Nachfolgende Untersuchungen des hETHE1 identifizierten C<sub>247</sub> als essentiell für die Enzymaktivität (Jung *et al.*, 2016). Außerdem wurde biochemisch mittels eines Gel-Shift Assays eine Modifikation dieses Restes nachgewiesen und diese als Polysulfidierung interpretiert. Die Ergebnisse deuteten darüber hinaus daraufhin, dass C<sub>247</sub> für die Polysulfidierung weiterer hETHE1-Cysteine verantwortlich zu sein scheint und diese die Aktivität des gesamten Enzyms kontrolliert.

Neben C<sub>247</sub> sind einige Aminosäurereste, deren Mutationen zum Auftreten von EE führen, in PDOs konserviert (Abb. 3.2). Sie sind entweder Teil der GSH-Bindungstasche oder des erweiterten Wasserstoffbrückennetzwerkes rund um das katalytische Eisenzentrum. R<sub>193</sub> ist ein besonderes Beispiel im hETHE1: Mutationen des Restes haben Einfluss auf die Proteinestabilität und auf das Redox-Potential des Eisens (Tiranti *et al.*, 2006, Henriques *et al.*, 2014). Trotz der offensichtlichen Bedeutung dieser konservierten Aminosäurereste wurden bislang keine umfassenden Mutagenese-Studien veröffentlicht, welche die Funktion einzelner Aminosäuren des Wasserstoffbrückennetzwerkes in PDOs berücksichtigen. Entgegen intensiver Forschung in den letzten 15 Jahren erfolgten nur wenige neue Erkenntnisse über den PDO-Reaktionsmechanismus. Eine kürzlich veröffentlichte, erste theoretische Studie basierend auf hETHE1 nutzte Quanten- bzw. Molekularmechanik gekoppelt an molekulardynamische Berechnungen um Reaktionsintermediate nachzuvollziehen (Lin *et al.*, 2016). Die Autoren kamen

zum Schluss, dass es vermutlich ausgehend von einem GSS<sup>+</sup>-Fe(II)-O<sub>2</sub> Zwischenzustand zu einem Angriff des distalen O<sub>2</sub> auf das Schwefelatom kommt, wobei ein Metall-gebundenes, aktiviertes O<sub>2</sub> zurückbleibt und Sulfit entsteht. Außerdem sagten sie voraus, dass H<sub>81</sub>, welches sich in unmittelbarer Nähe zum Eisenzentrum befindet und einen Teil eines konservierten Aminosäuremotivs um die Eisenliganden herum bildet, eine wichtige Rolle bei der Bindung des Sulfanschwefels von GSSH einnimmt. In einer zweiten Studie wurden spektroskopische Untersuchungen mit GSS-Nitrosyl-Äquivalenten gekoppelt mit quantenphysikalischen Berechnungen durchgeführt, um mögliche Intermediate zu charakterisieren (Goudarzi *et al.*, 2018). Basierend auf diesen Berechnungen und dem Mechanismus von Cystein Dioxygenasen, welche ebenfalls nicht-Häm Eisen-Dioxygenasen darstellen (McCoy *et al.*, 2006a, Fischer *et al.*, 2018), wurde ein allgemeiner Reaktionsmechanismus für PDOs vorgeschlagen, welcher sich jedoch lediglich auf die Reaktion am katalytischen Eisen fokussiert und etwaige Funktionen von (konservierten) Aminosäuren des Wasserstoffbrückennetzwerkes und der Substratbindungstasche außer Acht lässt. Auch viele biochemische Aspekte, wie die postulierte Polysulfidierung von C<sub>247</sub>, die Wirkungsweise von Thiol-reaktiven Inhibitoren und deren Zusammenhänge, sind noch weitgehend unverstanden.

Die hier vorgelegte Arbeit hatte zum Ziel, die biochemischen und strukturellen Eigenschaften der bakteriellen AcPDO zu beschreiben. Hierbei sollte eine erste umfassende Mutagenese-Studie von Aminosäuren der Bindungstasche und des erweiterten Wasserstoffbrückennetzwerkes um das Eisenzentrum durchgeführt werden. Außerdem war es ein Ziel, die Röntgenkristallstruktur der AcPDO aufzuklären, das Eisenzentrum spektroskopisch zu charakterisieren und Modifikationen an Cystein-Resten zu identifizieren. Die kombinierten Ergebnisse sollten einen Beitrag zu einem detaillierten Verständnis des Reaktionsmechanismus von PDOs leisten.



**Abbildung 3.2 | Alignment eisenhaltiger Persulfid Dioxygenase (PDO) Sequenzen.** Gensequenzen wurden von GenBank heruntergeladen, mit Hilfe von MAFFT aligniert und manuell im Hinblick auf ihre 3D-Strukturen korrigiert (GenBank/PDB ID). Typ I, Typ II und Typ III Enzyme wurden nach Xia *et al.* (2017) gruppiert. Zylinder, α-Helices; Pfeile, β-Faltblätter; |, Aminosäuren die nach Tiranti *et al.* (2004), Tiranti *et al.* (2006) und Jung *et al.* (2016) in Zusammenhang mit EE stehen; +, Eisenliganden; #, Cystein-Reste (oberflächenexponiert); ◊, weitere Cystein-Reste der AcPDO; •, Aminosäuren der sekundären Koordinationssphäre und des Wasserstoffbrückennetzwerkes; ↑, GSH-bindende Aminosäuren in allen PDOs; ↑, GSH-bindende Aminosäuren in TypI-PDOs; ↑, GSH-bindende Aminosäuren in TypII-PDOs.



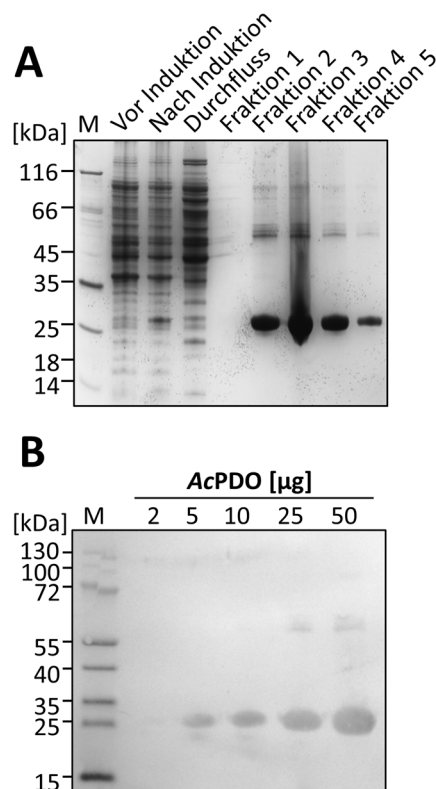
## Ergebnisse

### 3.1 Biochemische Charakterisierung der AcPDO

Das *Acidithiobacillus caldus pdo*-Gen wurde in *E. coli* BL21 exprimiert und das Protein durch C-terminale Strep-Tag-Fusion mittels Säulenaffinitätschromatographie aufgereinigt.

Die durchschnittlichen Proteinausbeuten der Reinigungen betrugen  $27,9 \pm 18,0$  mg/l LB-Medium ( $n = 33$  Präparationen), mit einem durchschnittlichen Eisengehalt der rekombinanten Proteine von  $0,77 \pm 0,1$  nmol/nmol Protein ( $n = 11$ , jede Präparation dreimal gemessen). SDS-PAGE zeigte eine Hauptproteinbande mit einer apparenten molekularen Masse von 27 kDa (Abb. 3.3 A). Western-Analysen bestätigten, dass es sich bei der Bande um das AcPDO Monomer handelt (Abb. 3.3 B). Ein weiteres schwächeres Signal mit einer apparenten molekularen Masse von  $\approx 57$  kDa (berechnet mittels  $R_f$  Werten) zeigt die dimere Form der AcPDO. Der Enzymtest für die PDO-Reaktion wurde auf Basis des modifizierten SOR-Enzymtests entwickelt (Rühl & Kletzin, 2017). Der schwefelhaltige Enzymtestpuffer wurde mit GSH versetzt und auf einem Thermoschüttler inkubiert. Anschließend wurde das Enzym zugegeben und die Reaktion in 10 Sekunden-Intervallen durch Überführung des Ansatzes in schwefelsaure Fuchsinlösung gestoppt (Gesamtreaktionszeit 50 s). Mittels dieses Assays wurden durchschnittliche Enzymaktivitäten von  $61,0 \pm 5,8$  U/mg Protein bei 40 °C und pH 7,5 in Anwesenheit von 1 mM GSH und 2 % (w/v) elementarem Schwefel ermittelt. ( $n = 23$  unabhängige Proteinpräparationen, 59 Messungen) Das Temperaturoptimum betrug 40 °C bei einer Temperaturspanne von 90 K mit einem pH-Optimum bei 7,5 (Abb. 3.4 AB)<sup>6</sup>.

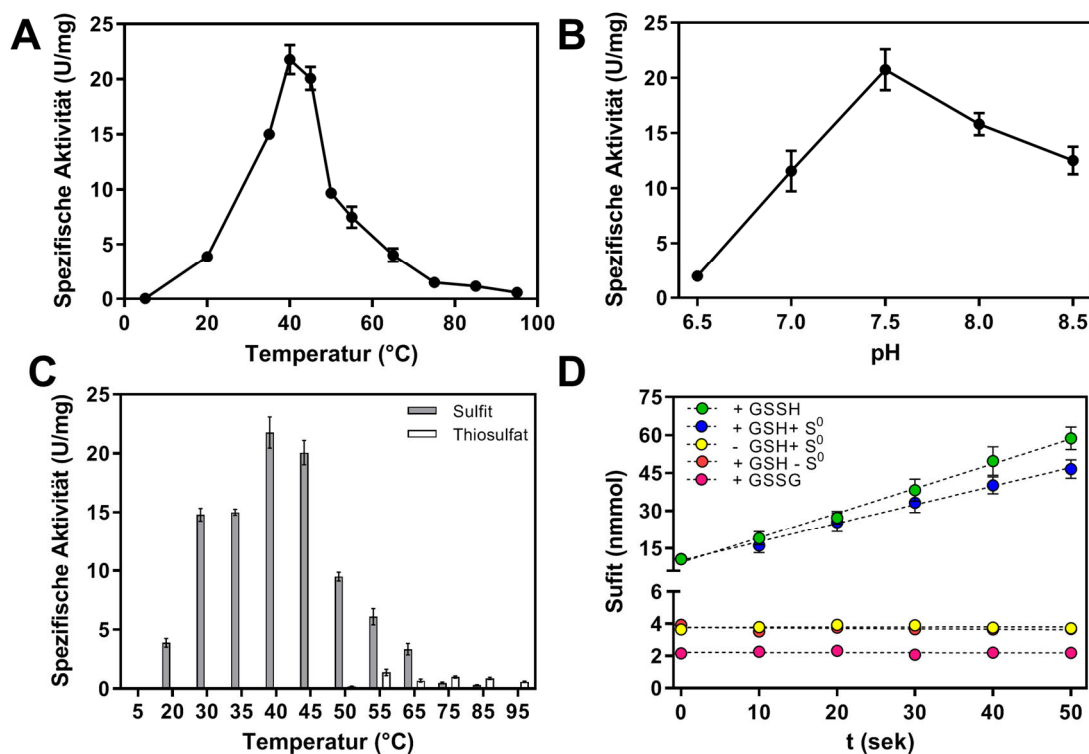
<sup>6</sup> **Anmerkung:** Die Enzymaktivitäten der Temperatur- und pH-Kurven wurden bei einer nicht-optimalen GSH Konzentration



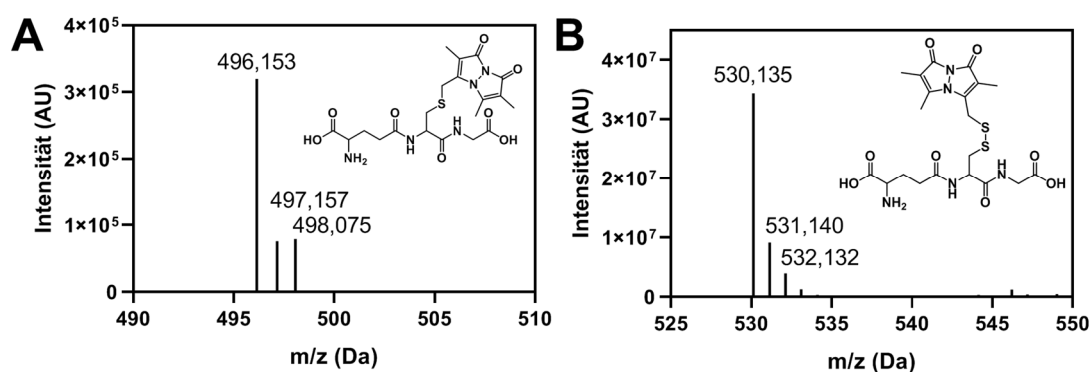
**Abbildung 3.3** | Polyacrylamid-Gel und Western-Analyse des AcPDO-Wildtyps. **A**, 10 % Tris-Tricin Polyacrylamidgel mit Gesamtzellextrakten vor und nach der Induktion der Genexpression (aus 100 µl Kultur), des Durchflusses der Säulenaffinitätschromatographie, des Ultrazentrifugations-Überstandes nach Zellaufschluss und den Elutionsfraktionen 1-5 (jeweils 10 µl). **B**, Western Analyse steigender Mengen AcPDO, hybridisiert mit Meerrettich-Peroxidase-gekoppelten Streptaktin. M: Markerproteine.

Nicht-enzymatische Thiosulfatbildung aus der Reaktion von elementarem Schwefel mit Sulfid trat bei Temperaturen ab 50 °C auf (Abb. 3.4 C). In Anwesenheit von chemisch synthetisierten GSSH war, im Vergleich zur Reaktion mit GSH und Schwefel als Substrat, eine leicht erhöhte Sulfidbildung im Reaktionszeitraum messbar, wobei weder Reaktionen ohne GSH und mit Schwefel noch mit Schwefel ohne GSH zu einer Sulfidbildung führten,

von 0,2 mM und in 2 min Zeitintervallen (10 min Gesamtreaktionszeit) ermittelt, noch vor der Optimierung des Enzymtests.



**Abbildung 3.4** | Temperatur- und pH Anhängigkeit der AcPDO-Enzymreaktion und Aktivitätsprofil. **A**, Temperaturprofil in einem Bereich zwischen 5 und 98 °C. **B**, pH-Profil in einem Bereich zwischen 6,5 und 8,5. Beide sind mit 0,2 mM GSH und 2 % [w/v] Schwefel im Enzymtestansatz gemessen wurden. Es wurden bis zu 100 µg/ml AcPDO-Wt eingesetzt. **C**, Anteile der Sulfit- und Thiosulfatbildung an der Gesamtaktivität der AcPDO-Reaktion bei pH 7,5 und verschiedenen Reaktionstemperaturen. **D**, Sulfitbildung des AcPDO-Wt mit 1 mM GSH, GSSH und GSSG in Anwesenheit und/oder Abwesenheit von 2 % [w/v] Schwefel. Es wurden 1 µg/ml Protein eingesetzt und nicht-enzymatische Kontrollen mitgeführt.

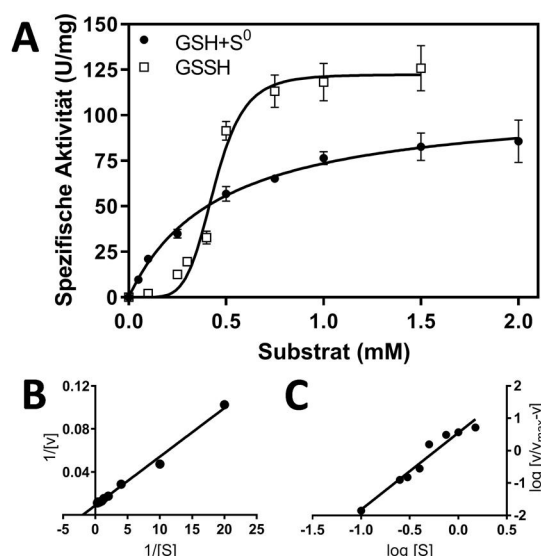


**Abbildung 3.5** | Massenspektrometrische Analysen von GSH und GSSH. **A**, GSH derivatisiert mit mBBr. **B**, Chemisch hergestelltes GSSH derivatisiert mit mBBr. Beide massenspektrometrischen Analysen wurden mittels Elektrosprayionisation im positiven Ionisierungsmodus durchgeführt.

ebensowenig wie oxidiertes Glutathion (GSSG; Abb. 3.4 D). Sowohl GSH als auch chemisch hergestelltes GSSH wurden mit Monobrombiman derivatisiert und anschließend massenspektrometrisch verifiziert (Abb. 3.5).

Die Bestimmung der Enzymkinetik ergab für die Reaktion mit GSH und im Überschuss

vorhandenen elementaren Schwefel eine typische Sättigungskinetik (Abb. 3.6 A) bis zu den höchsten getesteten GSH-Konzentrationen (7,5 mM; Abb. 3.6, GSH-Konzentrationen bis 2 mM dargestellt). Diese und der resultierende Lineweaver-Burk-Plot (Abb. 3.6 B) ergaben einen  $K_M$ -Wert von  $\approx 0,5$  mM, einen

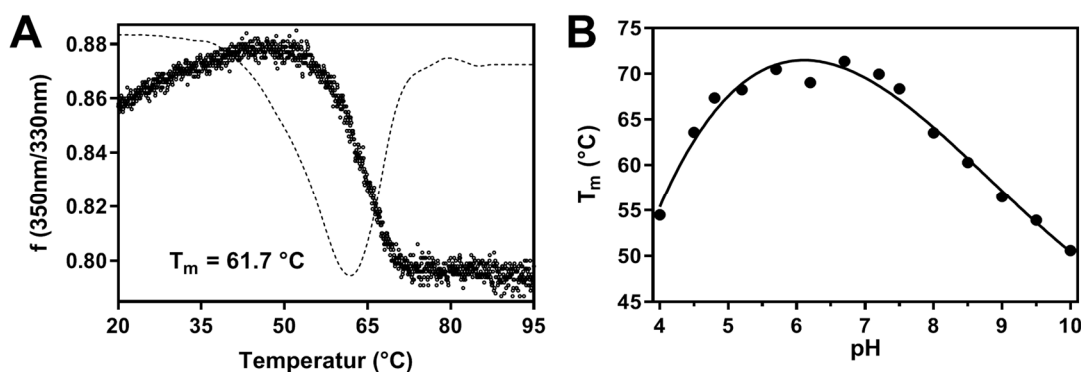


**Abbildung 3.6** | Enzymkinetiken der AcPDO. **A**, Auftragung der spezifischen Enzymaktivität gegenüber steigenden Substratkonzentrationen mit GSH und 2 % [w/v] Schwefel und GSSH. Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichungen von drei unabhängigen Messungen. **B**, Lineweaver-Burk Auftragung für die Enzymkinetik in Anwesenheit von GSH und Schwefel. **C**, Hill-Auftragung für die Enzymkinetik in Anwesenheit von GSSH.

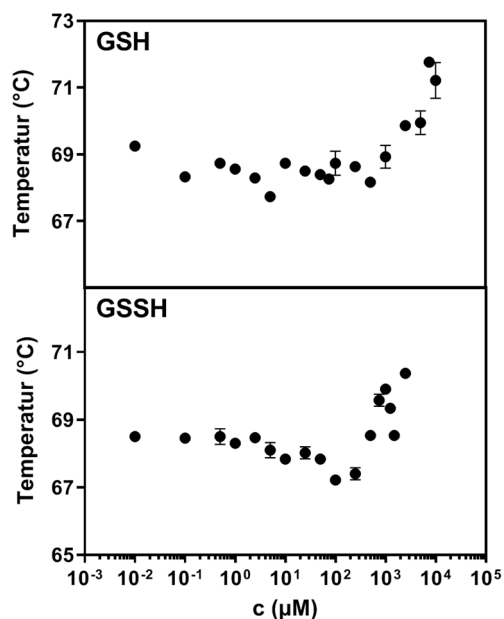
$V_{\max}$  von  $111,5 \text{ U mg}^{-1} \text{ Protein}$ , ein  $K_{\text{cat}}$  von  $181 \text{ s}^{-1}$  und einer Spezifitätskonstanten  $K_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$  von  $361 \text{ s}^{-1} \text{ mM}^{-1}$  pro Untereinheit. Die Aktivitäten mit chemisch hergestellten GSSH waren mit  $118 \text{ U mg}^{-1} \text{ Protein}$  in Anwesenheit von  $1 \text{ mM}$  GSSH höher als mit gleichen GSH-Konzentrationen und die konzentrationsabhängige Enzymreaktion entsprach keiner

Michaelis-Menten-Kinetik, sondern zeigte einen sigmoidalen Verlauf, was auf positive Kooperativität der Enzymuntereinheiten hindeutet (Abb. 3.6 A). Der  $V_{\max}$  der Enzymkinetik mit GSSH betrug  $122,3 \text{ U mg}^{-1} \text{ Protein}$  bei  $1 - 1,5 \text{ mM}$  GSSH, bei einem  $K_{\text{cat}}$  von  $198 \text{ s}^{-1}$ . Der resultierende Hill-Plot (Abb. 3.6 C) ergab einen Hill-Koeffizienten  $n_{\text{H}}$  von  $2,3 \pm 0,2$ , was auf mehr als zwei Untereinheiten im aktiven Holoenzym hindeutet.

*Differential Scanning Fluorimetry* (DSF)-Messungen der intrinsischen Tyrosin- und Tryptophan-Fluoreszenz zeigten eine mittlere Denaturierungstemperatur von  $63,0 \pm 1,3 \text{ }^{\circ}\text{C}$  bei einer Heizrate von  $1 \text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$  (Abb. 3.7 A). Die Ergebnisse der Schmelzkurve deuten, zusammen mit der Temperaturkurve, daraufhin, dass die Enzymaktivitäten im Bereich über  $65 - 70 \text{ }^{\circ}\text{C}$  aufgrund der kurzen Reaktionszeit von lediglich  $50 \text{ s}$  detektierbar waren. Das Enzym scheint demnach langsam in seiner Denaturierungskinetik zu sein. Obwohl das pH-Optimum bei  $7,5$  ermittelt wurde ist die AcPDO in einem pH-Bereich zwischen  $6,0$  und  $7,0$  mit Schmelzpunkten von  $70,4 - 71,3 \text{ }^{\circ}\text{C}$  am stabilsten (Abb. 3.7 B). Im sauren pH-Bereich kam es zu einem rapiden Absinken der Thermostabilität bis  $\text{pH } 4$  ( $T_{\text{M}}$ :  $54,5 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ), im Alkalischen zu einem langsameren Verlust der Thermostabilität bis  $\text{pH } 10$  ( $T_{\text{M}}$ :  $50,6 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ). Die Anwesenheit von GSH führte ab einer GSH-Konzentration von  $1 \text{ mM}$  zu einer sukzessiven



**Abbildung 3.7** | Denaturierung der AcPDO mittels *Differential Scanning Fluorimetry*. **A**, Auftragung der intrinsischen Tryptophan/Tyrosin-Fluoreszenz gegen steigende Konzentrationen mit erster Ableitung der resultierenden Denaturierungskurve (gestrichelte Linie). **B**, pH-Abhängigkeit der AcPDO-Denaturierung. Für den pH-Bereich von  $4 - 7,5$  wurde ein  $50 \text{ mM}$  Citrat-Puffer, zwischen  $7,5 - 9,0$  ein  $50 \text{ mM}$  Tris/HCl-Puffer und zwischen  $9,0 - 10,0$  ein  $50 \text{ mM}$  Glycin-Puffer verwendet.



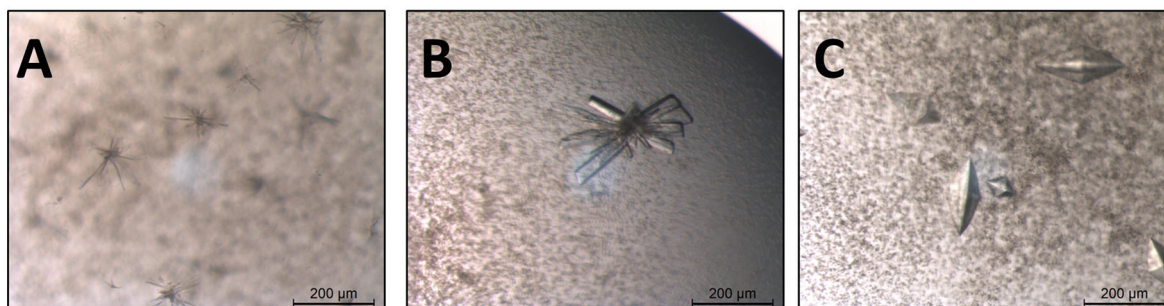
**Abbildung 3.8** | Abhängigkeit der AcPDO-Stabilität von steigenden Substrat- bzw. Produktkonzentrationen. Aufgetragen sind jeweils steigende GSH- bzw. GSSH-Konzentrationen gegen den Schmelzpunkt des AcPDO-Wildtyps. Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung aus mindestens drei unabhängigen Messungen.

Stabilisierung des Enzyms bis 10 mM (Abb. 3.8). Konzentrationen ab 25 mM resultierten in einem starken Abfall der Thermostabilität auf  $\approx 49$  °C (nicht gezeigt). GSSH-Konzentrationen bis  $2,5 \mu\text{M}$  zeigten keinen signifikanten Effekt auf die Thermostabilität. Bei Konzentrationen über  $2,5 \mu\text{M}$  kam es zu leichten Destabilisierungseffekten bis zu einer Konzentration von  $100 \mu\text{M}$  GSSH. GSSH-Konzentrationen über  $100 \mu\text{M}$  resultierten, analog zur Inkubation mit GSH, in einer Stabilisierung des Enzyms (Abb. 3.8).

### 3.2 Kristallisation und Strukturanalyse der AcPDO

Heterolog gereinigte AcPDO mit einer Konzentration von  $11,8 \text{ mg ml}^{-1}$  in 50 mM Tris/HCl Puffer pH 7,5 wurde für die Proteinkristallisation verwendet. Initiale Kristallisationsversuche wurden bei 295 K mit Kristallisations-Screening Kits mittels der *sitting-drop* Dampfdiffusions-Methode durchgeführt.

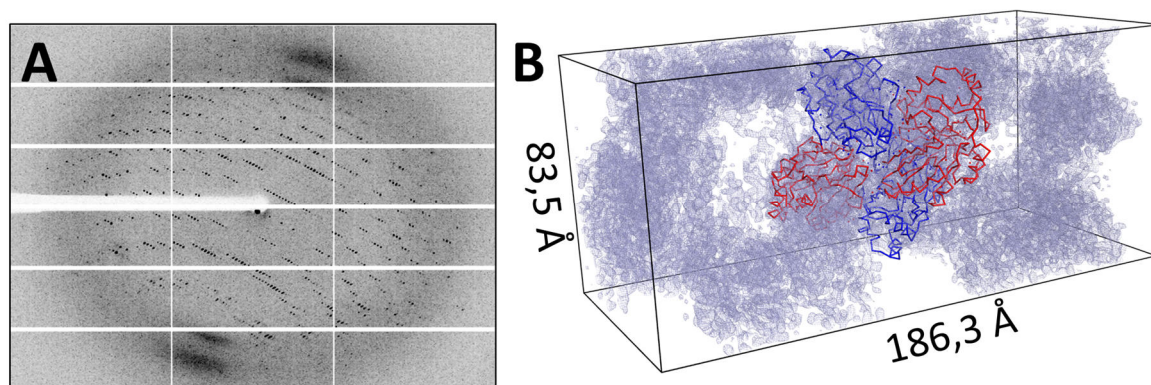
Aus insgesamt 192 getesteten Bedingungen, mit jeweils drei verschiedenen Verhältnissen von Proteinlösung: Kristallisationslösung wurden acht ermittelt unter denen innerhalb von sieben Tagen Proteinkristalle mikroskopisch sichtbar waren. Morphologisch waren die Proteinkristalle in den meisten Fällen kleine Nadeln (Abb. 3.9 A), weshalb sechs der Bedingungen im größeren Maßstab mit geändertem pH, Inkubationstemperatur, Fällungsmittel- und Salzkonzentrationen mittels der *hanging-drop* Dampfdiffusions-Methode angesetzt wurden. Eine der getesteten Bedingungen resultierte in größeren nadelförmigen Proteinkristallen, die jedoch nicht für die Röntgendiffraktions-Messungen geeignet waren. Die größten Nadeln traten in einer Kristallisationslösung mit 0,1 M DL-Äpfelsäure, pH 7,0 und 12 % [w/v] PEG 3350 bei 293 K auf (Abb. 3.9 B). Die Zugabe von 20 mM Hexaammincobalt(III)-Chlorid resultierte in einem Auftreten von farblosen, trigonal bipyramidalen Proteinkristallen, die sich innerhalb von 24 h aus dem Proteinpräzipitat bildeten



**Abbildung 3.9** | Mikroskopische Analyse des Kristallisationsprozess von AcPDO Wildtyp-Kristallen. **A**, AcPDO-Wildtyp kristallisiert in 0,15 M DL-Äpfelsäure und 20 % [w/v] PEG 3 350. **B**, AcPDO-Wildtyp kristallisiert in 0,1 M DL-Äpfelsäure und 20 % [w/v] PEG 3 350. **C**, AcPDO-Wildtyp kristallisiert in 0,1 M DL-Äpfelsäure, 12 % PEG 3 350 und 20 mM Hexaammincobalt(III)-Chlorid.

**Tabelle 3.1** | Kristallographische Parameter, Röntgendiffraktionsdaten und *Refinement*-Statistiken der AcPDO-Kristallstrukturen. Werte in Klammern beziehen sich auf die Schale mit der höchsten Auflösung.

	AcPDO Wt	AcPDO-GSH	AcPDO-GSSH
Datenerfassung	DLS I03 ESRF ID30-b	ESRF ID30-b	ESRF ID30-b
Raumgruppe	P 4 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2	P 4 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2	P 4 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2
Wellenlänge (Å)	0,9763 Å	0,9763 Å	0,9763 Å
Auflösung (Å)	76,19-2,07(2,19-2,07)	62,28-2,42(2,46-2,42)	82,47-2,39 (2,54-2,39)
Parameter der Einheitszelle (Å)	a=b=83,5 c=186,3	a=b=81,7 c=186,8	a=b=82,5 c=186,0
Anzahl der individ. Intensitäten	41 072	25 046	26 132
Multiplizität	24,6	24,7	24,6
I / σ (I)	3,4 (0,62)	4,1 (2,5)	3,18 (0,60)
R <sub>sym</sub> (%)	10,4 (4,5-482,0)	14,7 (5,1-133,8)	15,0 (4,3-508,1)
R <sub>meas</sub> (%)	10,6 (4,7-493,9)	15,0 (5,3-136,8)	15,4 (4,4-519,1)
R <sub>pim</sub> (%)	0,0185 (0,2241)	3,0 (1,3)	2,4 (0,7)
Vollständigkeit (%)	99,9 (99,5)	100(100)	99,6(97,6)
Wilson B Faktor (Å <sup>2</sup> )	57,98	56,04	75,88
<b>Refinement</b>			
Proteinmoleküle / asym. Einheit	2	2	2
Aminosäuren / Kette (gesamt)	225 (450)	225 (450)	225 (450)
Anzahl von Wassermolekülen	85	6	6
Anzahl von Eisenatomen	2	2	2
R <sub>work</sub> / R <sub>free</sub>	0,1937 / 0,1937	0,2391 / 0,2888	0,2256 / 0,2644
Durchschn. ADP <sup>1</sup> (Å)	74,8	76,5	87,9
Bindungen r.m.s.d. <sup>2</sup> (Å)	0,019	0,046	0,028
Winkel r.m.s.d. (°)	1,032	1,068	1,060

<sup>1</sup> Atomic Displacement Parameter, <sup>2</sup> root mean square deviation**Abbildung 3.10** | Röntgenbeugung und Raumgruppe der AcPDO. **A**, Exemplarisches Röntgenbeugungsbild eines AcPDO-Wildtyp-Kristalls der Raumgruppe P 4<sub>1</sub> 2<sub>1</sub> 2 mit einer Auflösung von ≈ 2,6 Å. **B**, Darstellung der AcPDO Einheitszelle mit Elektronendichte und zwei kristallographisch asymmetrischen Einheiten.

(Abb. 3.9 C). Solche Kristalle wurden nach ca. 3 – 5 Tagen in kryoprotektive Lösung (Kristallisationslösung mit 20 % [w/v] Glycerin) überführt und anschließend in flüssigen Stickstoff schockgefroren. Für Kristallisationsexperimente in Anwesenheit von GSH bzw. GSSH wurden die Kristalle zuvor in eine Kristallisationslösung mit 0,1 – 5 mM GSH bzw.

GSSH überführt, für 1 h bei 278 K inkubiert und anschließend in kryoprotektive Lösung überführt und schockgefroren.

Die Proteinkristalle der AcPDO wurden mit Wellenlängen von 0,967 bzw. 1,737 Å gemessen und kristallisierten in der tetragonalen Raumgruppe P 4<sub>1</sub> 2<sub>1</sub> 2 (*International Tables for Crystallography*; Nr. 92; Hahn *et al.*



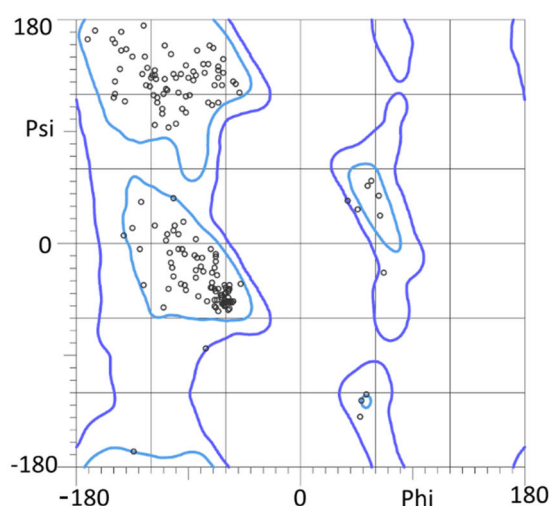
(1983)) in einer Elementarzelle mit den Dimensionen  $a=b=83,5 \text{ \AA}$ ,  $c=186,3 \text{ \AA}$  und einem Volumen von  $1,3 \times 10^6 \text{ \AA}^3$  (Tab. 3.1; Abb. 3.10). Das Phasenproblem wurde durch *molecular replacement* mit der Persulfid Dioxygenase aus *Myxococcus xanthus* (MxPDO, PDB ID 4YSB, Sattler *et al.* (2015), Sequenzidentität: 59 %) als Suchmodell gelöst. Der native AcPDO Wildtyp kristallisierte mit einer Auflösung von  $2,60 \text{ \AA}$ , wobei verschiedene AcPDO-Kristalle genutzt wurden um die Auflösung der Strukturmodells sukzessive zu verbessern, was zu einer finalen Auflösung der nativen AcPDO von  $2,07 \text{ \AA}$  führte. Proteinkristalle, die mit GSH inkubiert wurden, kristallisierten mit einer Auflösung von  $2,42 \text{ \AA}$  und Proteinkristalle, die mit GSSH inkubiert wurden mit einer Auflösung von  $2,39 \text{ \AA}$  (Tab. 3.1). Hierbei konnte jedoch keine eindeutige Elektronendichte für das entsprechende Produkt/Substrat identifiziert werden. Die jeweiligen quadratischen Mittelabweichungen (*root mean square deviation*; r.m.s.d.) betragen im Vergleich zum nativen Enzym  $0,22 \text{ \AA}$  für die AcPDO-GSH-Struktur und  $0,21 \text{ \AA}$  für die AcPDO-GSSH-Struktur. Unterschiede ergeben sich dabei insbesondere in der Anordnung der Eisen-koordinierenden Wassermoleküle. Während das zentrale Wasser ( $\text{H}_2\text{O}^1$ , Vgl. Abb. 3.16) in der nativen Form des Enzyms in einem gleichmäßigen Abstand von  $3,1 \text{ \AA}$  von den anderen beiden Wassermolekülen entfernt ist, verringert sich der Abstand auf  $2,0 - 2,4 \text{ \AA}$  in den jeweiligen GSH- bzw. GSSH-Strukturen.

Es zeigte sich, dass die asymmetrische Einheit der AcPDO ein Dimer darstellt, wobei sich zwei der asymmetrischen Einheiten in der Kristallstruktur dicht zusammenlagern (Abb. 3.10 B). Die Gesamtoberfläche der asymmetrischen Einheit beträgt  $19\,699,7 \text{ \AA}^2$  (berechnet mittels AREAIMOL aus der CCP4 Suite; Winn *et al.* (2011)). Die Struktur beinhaltet die Aminosäuren 1 – 225, wobei die C-terminalen zehn Aminosäuren, zuzüglich des Strep-Tags, keine Elektronendichte aufwiesen und somit nicht modelliert wurden. Dies deu-

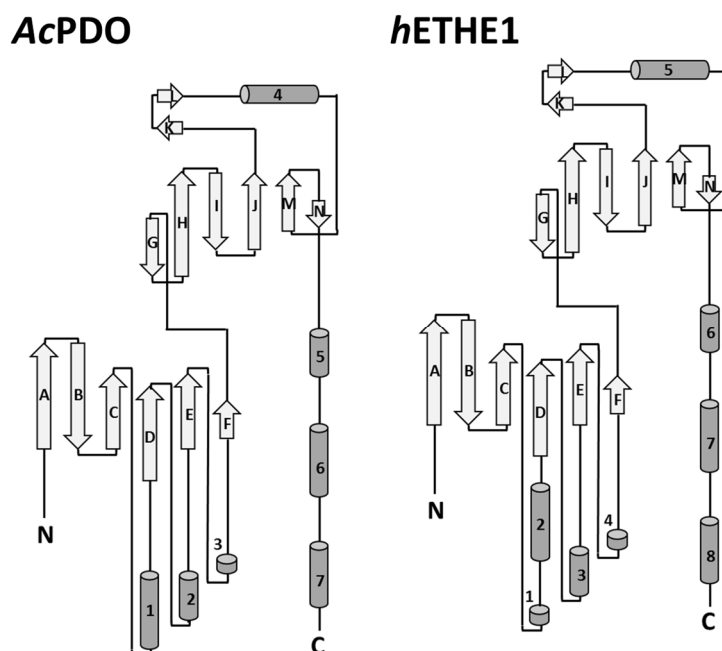
tet auf eine nicht geordnete Natur bzw. eine hohe Flexibilität dieses Bereiches hin. Ähnliches wurde bereits für die MxPDO beobachtet (Sattler *et al.*, 2015).

Nach *Refinement* und Optimierung wurde die Qualität der AcPDO-Struktur anhand der Verteilung von Kombinationen der Diederwinkel  $\varphi$  und  $\psi$  der Protein-backbones mittels Ramachandran-Analyse validiert (Abb. 3.11). Diese ergab ein Vorkommen von 94,2 % der Aminosäuren in der energetisch favorisierten Konformation, wobei 5,8 % in einer energetisch zulässigen Konformation vorliegen. Bezogen auf die Rotamere befinden sich 93,5 % in einer energetisch favorisierten Position und 4,4 % in einer energetisch zulässigen Konformation mit 2,1 % Ausreißern. Es sind keine unzulässigen Bindungen oder Bindungswinkel vorhanden. Eine Auswertung der Sekundärstrukturelemente, ausgehend von der 3D-Struktur, ergab einen Anteil von 28,0 %  $\alpha$ -Helices, 27,5 %  $\beta$ -Faltblättern, 29,8 % Turns und 14,6 % Coils.

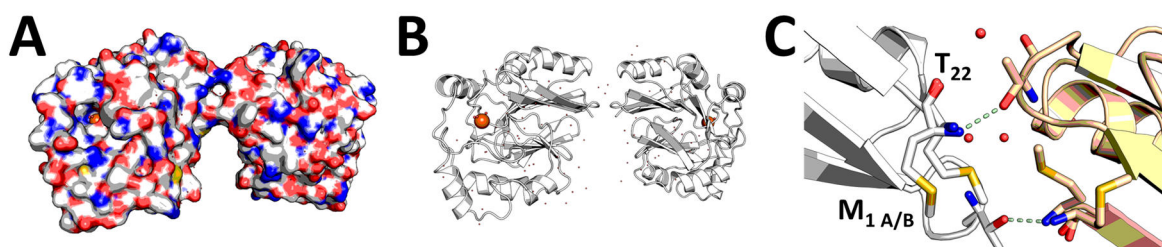
Strukturvergleiche der A-Untereinheit der AcPDO mit der MxPDO ergeben eine r.m.s.d. von  $0,45 \text{ \AA}$  (über 225 C $\alpha$ -Atome). Vergleiche



**Abbildung 3.11** | Ramachandran-Diagramm der AcPDO Kristallstruktur. Dargestellt sind die  $\psi$ - und  $\phi$ -Torsionswinkel der A-Untereinheit und deren Einteilung in energetisch favorisierte und energetisch günstige Konformation (hellblaue bzw. dunkelblaue Umrandung).



**Abbildung 3.12** | Darstellung der Proteintopologie der AcPDO und des hETHE1.  $\alpha$ -Helices sind als Zylinder,  $\beta$ -Faltblätter als Pfeile dargestellt.



**Abbildung 3.13** | Strukturelle Darstellung der asymmetrischen Einheit der AcPDO. **A**, Oberflächendarstellung. **B**, Darstellung von  $\alpha$ -Helices und  $\beta$ -Faltblättern mit den katalytischen Eisenatomen (braune Kugeln) und Wassermolekülen (rote Punkte). **C**, Darstellung der Interaktionsfläche der asymmetrischen Einheit mit eingezeichneter Wasserstoffbrückeninteraktion und Wassermolekülen (rote Kugeln).  $M_1$  ist in beiden Untereinheiten in zwei verschiedenen Seitenketten-Konformationen vorhanden (A/B).

mit der humanen Persulfid Dioxygenase (hETHE1; Pettinati *et al.* (2015); PDB ID: 4CHL) resultieren in einer r.m.s.d. von 0,42 Å (über 221 C $\alpha$ -Atome), was auf eine hohe Ähnlichkeit der Strukturen hindeutet. Die Proteintopologie der AcPDO- und des hETHE1-Untereinheiten sind dabei grundlegend identisch. Beide zeigen eine für Metallo- $\beta$ -Lactamasen typische  $\alpha\beta\alpha$ -Anordnung mit zwei zentralen  $\beta$ -Faltblattstrukturen, die jeweils sechs  $\beta$ -Stränge enthalten und von  $\alpha$ -Helices umgeben sind (Abb. 3.12). Die  $\beta$ -Stränge A, B und C des ersten  $\beta$ -Faltblatts sind antiparallel angeordnet, D, E und F parallel. Im zweiten

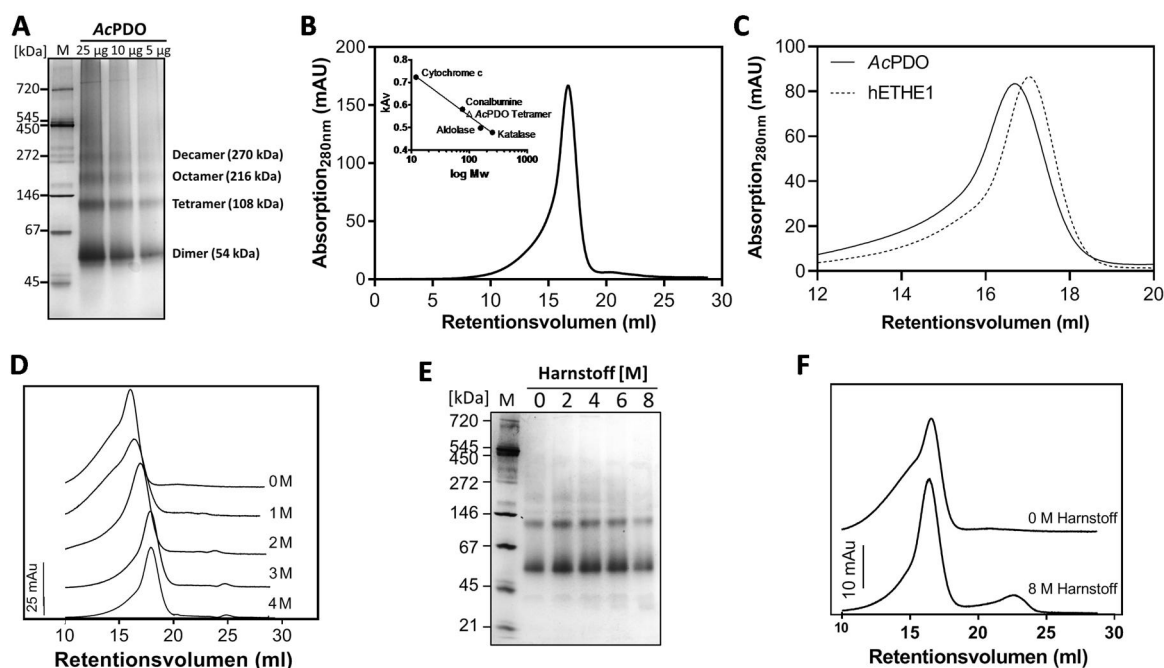
$\beta$ -Faltblatt sind die  $\beta$ -Stränge G – J und K – L antiparallel angeordnet. Die letzten beiden antiparallelen  $\beta$ -Stränge M und N sind von einer  $\alpha$ -Helix von den übrigen getrennt. Insgesamt besteht die AcPDO Struktur aus 14  $\beta$ -Strängen, 7  $\alpha$ -Helices, 12 Turns und 16 Coils. In der hETHE1 Struktur ist die Helix 1 von einer Loop-Region unterbrochen, dafür aber länger als in der AcPDO.

Die Kontaktfläche der beiden Untereinheiten ist in der AcPDO deutlich geringer verglichen mit anderen PDOs und wird nur durch die Aminosäuren  $M_1$  und  $T_{22}$  vermittelt (Abb. 3.13).

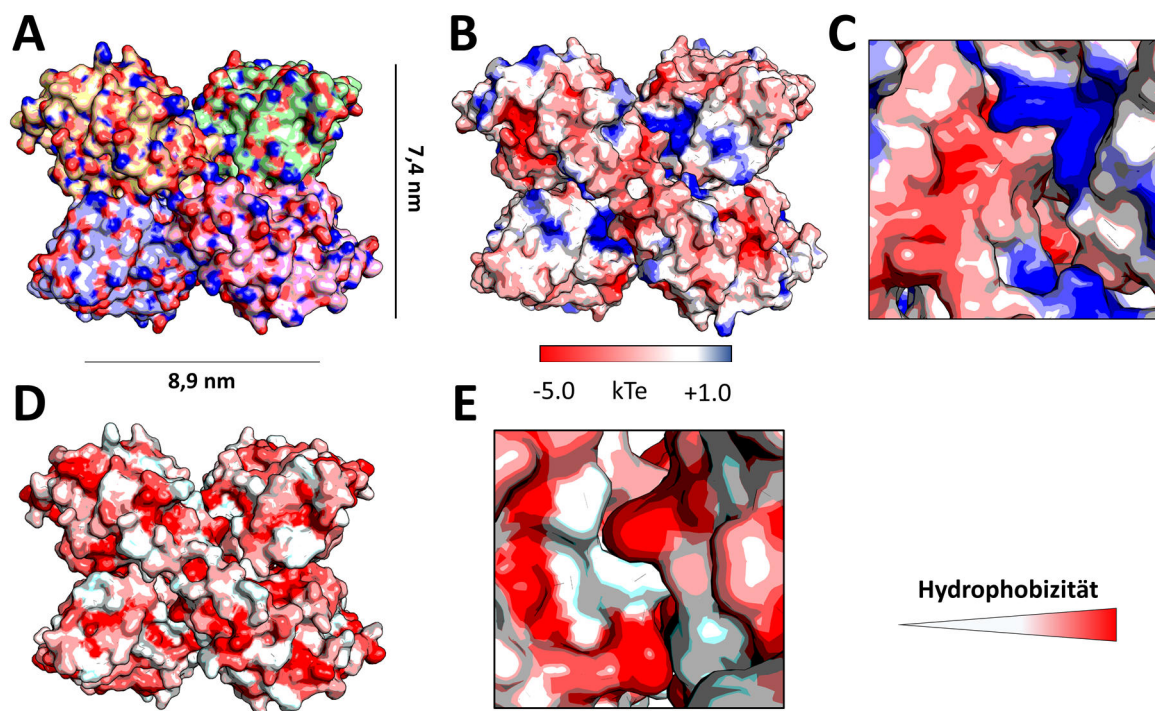
### 3.3 Oligomerisierungszustände der AcPDO

Aufgrund der geringen Dimer-Interaktionsfläche der AcPDO wurde der Oligomerisierungszustand in Lösung bestimmt. Native Polyacrylamid-Gelelektrophorese zeigte, neben einer Dimer-Bande mit einer apparenten molekularen Masse von 54 kDa, weitere Proteinbanden mit apparenten molekularen Massen von 108 kDa, 216 kDa und 270 kDa (Abb. 3.14 A). Diese entsprechen einer Oligomerisierung der AcPDO als Tetramer, Oktamer und Dekamer. Gelpermeationschromatographie (GPC) von frisch isolierter AcPDO resultierte in einem Haupt-Elutionspeak mit einer apparenten molekularen Masse von  $99,4 \pm 1,5$  kDa ( $n = 3$ ; Abb. 3.14 B). Dies entspricht rechnerisch einem Vorkommen von 3,7 Un-

tereinheiten und deutet auf eine tetramere Organisation in Lösung hin. Im Gegensatz dazu zeigen GPC-Analysen des humanen Enzyms eine dimere Organisation (rechnerisch 2,2 Untereinheiten) in Lösung mit einer apparenten molekularen Masse von  $59,1 \pm 0,7$  kDa ( $n = 3$ ; Abb. 3.14 C). Die langsame Steigung, sowohl der AcPDO als auch des hETHE1, im Bereich niedriger Retentionsvolumina könnte ein Hinweis auf das Vorhandensein höherer Oligomerisierungszustände sein, wie sie für die AcPDO in den nicht-denaturierenden Gelen zu sehen sind. Dieser Effekt wurde verstärkt, wenn zuvor eingefroren gelagerte Proteinpräparationen genutzt wurden, was in einer zusätzlichen Schulter im Chromatogramm mit einer apparenten molekularen Masse von  $\approx 380$  kDa resultierte (Abb. 3.14 D). GPC von Guanidinium Hydrochlorid-



**Abbildung 3.14 |** Native AcPDO und die Auswirkung von Denaturierungsmitteln. **A**, Nicht-denaturierendes 4-16 % Polyacrylamidgel mit verschiedenen Mengen AcPDO. M: Nativer Proteinmarker für BN/CN (Serva, Heidelberg). **B**, Gelpermeationschromatographie frisch isolierter AcPDO (0,5 mg Protein) mit Eichproteinen. **C**, Gelpermeationschromatographie frisch isolierter AcPDO im Vergleich zu frisch isoliertem hETHE1 (jeweils 0,25 mg Protein). **D**, Gelpermeationschromatographie von zuvor eingefrorener AcPDO (0,1 mg Protein) in Anwesenheit verschiedener Guanidinium-Hydrochlorid-Konzentrationen. **E**, Nicht-denaturierendes 4-16 % Polyacrylamidgel mit 20 µg AcPDO nach Inkubation mit verschiedenen Harnstoff-Konzentrationen. **F**, Gelpermeationschromatographie von zuvor eingefrorener AcPDO (0,1 mg Protein) unter nativen Bedingungen und in Anwesenheit von 8 M Harnstoff.



**Abbildung 3.15** | Strukturelle Darstellung des AcPDO Tetramers. **A**, Das AcPDO Tetramer bestehend aus zwei kristallographisch asymmetrischen Einheiten und dessen Ausmaße. **B**, Elektrostatische Oberflächenpotentiale des AcPDO Tetramers.  $k$ : Boltzmann-Konstante;  $T$ : Temperatur für die Berechnung;  $e$ : Ladung eines Elektrons. **C**, Untereinheiteninteraktionen aufgrund des Zusammenspiels positiver und negativer Ladungen auf der Proteinoberfläche. **D**, Darstellung der Hydrophobizität der AcPDO Enzymoberfläche. Helle Bereiche entsprechen hydrophilen und rote Bereiche hydrophoben Regionen. **E**, Untereinheiteninteraktionen aufgrund des Zusammenspiels von hydrophilen und hydrophoben Regionen auf der Proteinoberfläche.

behandelter AcPDO hatte eine konzentrationsabhängige, schrittweise Erhöhung des Retentionsvolumens zur Folge, was auf eine Zersetzung des Tetramers in Dimere in Anwesenheit von 2 M Guanidinium und in Monomere in Anwesenheit von 3 M Guanidinium hindeutet (Abb. 3.14 D). Bei Inkubation des Enzyms mit Harnstoff ergab sich dagegen keine Intensitätsabnahme der Dimer- und Tetramerbanden in nicht denaturierenden Gelen. Eine Monomerbande trat zwar bei Konzentrationen ab 4 M Harnstoff auf, jedoch war diese nur sehr schwach vorhanden und sowohl Dimer- als auch Tetramerbanden blieben, sogar bei Konzentrationen bis 8 M Harnstoff, am stärksten ausgeprägt (Abb. 3.14 E). Auch in GPC Analysen resultierte die Inkubation mit 8 M Harnstoff nicht in einer Änderung des Tetramer-Peaks, wobei die 380 kDa-Schulter des zuvor gefrorenen Enzyms verschwand (Abb. 3.14 F). Der zusätzliche Peak bei einem Re-

tentionsvolumen von 22,73 ml entspricht einer molekularen Masse von  $\approx 0,9$  kDa und zeigte keine Banden im SDS-Gel (nicht gezeigt). Es ist daher davon auszugehen, dass es sich um eine niedermolekulare Verbindung handelt, möglicherweise dem Desthiobiotin aus dem Elutionspuffer.

Auch die Kristallstruktur der AcPDO deutet auf eine Tetramerisierung des Proteins hin. So liegen in der Struktur jeweils zwei Dimere dicht gepackt als Tetramer, mit Ausmaßen von  $\approx 8,9 \times 7,4 \times 5,2$  nm, zusammen und bilden höchstwahrscheinlich die biologisch aktive Einheit des Enzyms (Abb. 3.15 A). Berechnungen der elektrostatischen Oberflächenpotentiale zeigten, dass sich die Proteinoberfläche hauptsächlich aus negativ geladenen Aminosäuren zusammensetzt und legen nahe, dass die Tetramerisierung durch das Zusammenspiel positiver und negativer Oberflächenladungen an der Schnittstelle zweier



Dimere vermittelt wird (genannt A-B und A'-B'; Abb. 3.15 BC). Betrachtet man sich die Hydrophobizität des Enzyms wird ebenso deutlich, dass hauptsächlich hydrophobe Aminosäurereste die Proteinoberfläche bilden und auch hier sowohl hydrophobe als auch hydrophile Reste an der Dimer-Schnittstelle miteinander interagieren.

Zusammengefasst scheint die AcPDO ein Tetramer in Lösung zu bilden, welches sowohl durch das Zusammenspiel positiver und negativer Oberflächenladungen als auch durch hydrophobe Wechselwirkungen vermittelt wird. Das Vorhandensein eines Dimers in der Form, welche die asymmetrische Einheit der Proteinkristalle nahelegte, erscheint aufgrund der geringen Interaktionsfläche, die lediglich durch zwei Aminosäuren vermittelt wird, unwahrscheinlich (Interaktionsfläche A-B-Dimer:  $2\,891\text{ Å}^2$ ; Tetramer A-A':  $5\,477\text{ Å}^2$ ; Tetramer A-B':  $5\,624\text{ Å}^2$ ). AcPDO-Dimere in nicht-denaturierenden Polyacrylamidgelen (Vgl. Abb. 3.14 A) sind demnach voraussichtlich Zusammenlagerungen zweier Monomere mit einer größeren Interaktionsfläche, vermutlich aus der kristallographisch nicht-asymmetrischen Einheit des Homotetramers.

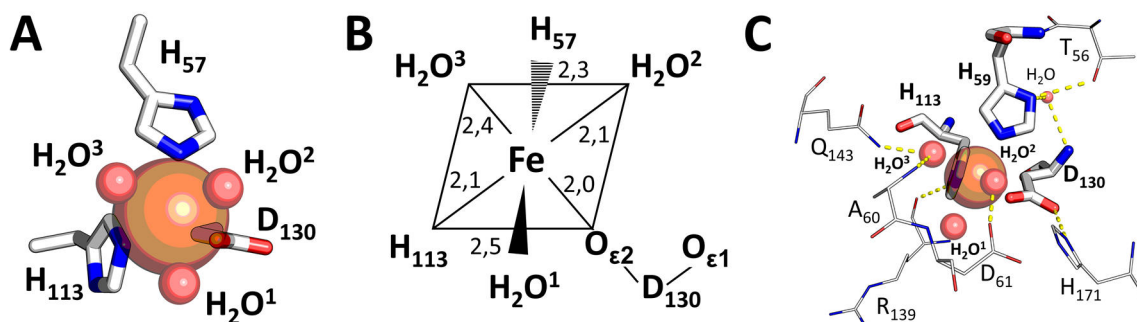
### 3.4 Charakterisierung des katalytischen Eisenzentrums

Das katalytische Zentrum der PDO ist ein mononukleares farbloses nicht-Häm Eisenatom. Dieses besitzt eine oktaedrische Koordinationssphäre und wird von den N $\epsilon$ -Atomen der Histidin-Reste (H<sub>57</sub> und H<sub>113</sub>), einem Sauerstoffatom des Aspartat-Restes D<sub>130</sub> und drei Wassermolekülen koordiniert (Abb. 3.16 AB). Dieses Strukturmotiv ist als 2-His-1-Carboxylat-Triade bekannt und typisch für mononukleare nicht-Häm Eisenenzyme und besonders bei Oxygenasen verbreitet (Hegg & Que, 1997, Bugg, 2001, Kal & Que, 2017). Die Eisenliganden sind in allen PDOs konserviert und essentiell für die Enzymaktivität (Rühl *et al.*, 2018). Die Position der H<sub>57</sub>-Seitenkette wird dabei von einem Wassermolekül stabili-

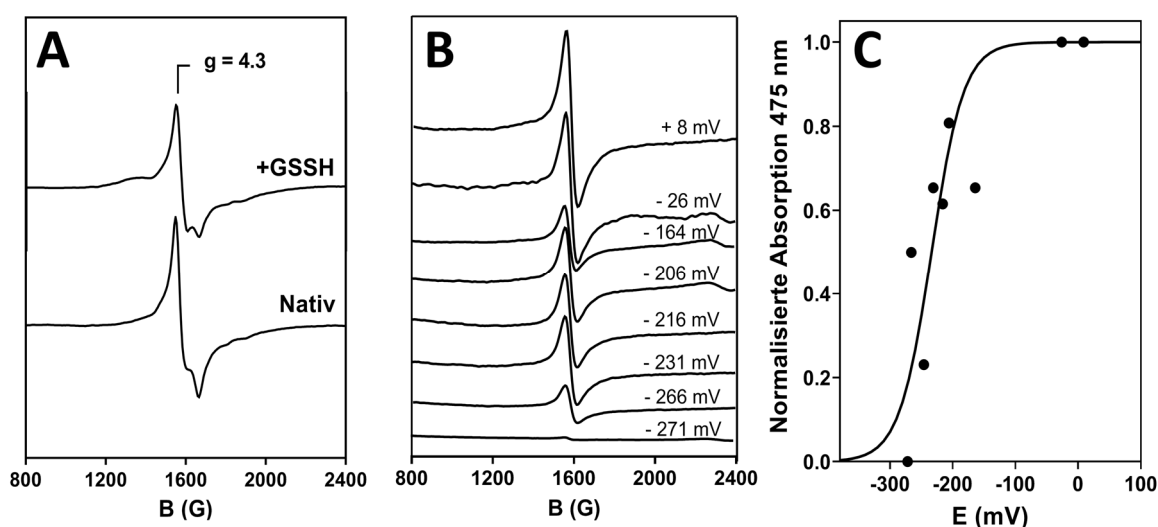
siert, das mit dem N $\delta$ -Atom mit dem D<sub>130</sub>-backbone-Stickstoff und O $\gamma$  des T<sub>56</sub>-Restes koordiniert (Abb. 3.16 C). Das N $\delta$ -Atom von H<sub>113</sub> wird vom backbone Sauerstoffatom des R<sub>139</sub>-Restes koordiniert. Das O $\delta$ 1 Atom der Carbonyl-Gruppe von D<sub>130</sub> liegt in Wasserstoffbrückendistanz zu H<sub>171</sub>. Die beiden Wassermoleküle H<sub>2</sub>O<sup>2</sup> und H<sub>2</sub>O<sup>3</sup> sind in Wasserstoffbrückendistanz zu N $\epsilon$  von Q<sub>143</sub> und zum A<sub>60</sub>-backbone-Stickstoff bzw. zum O $\delta$ 1 Atom der Carbonyl-Gruppe von D<sub>61</sub>. Das zentrale Wasser H<sub>2</sub>O<sup>1</sup> ist außerhalb von möglichen Wasserstoffbrückendistanzen und wird lediglich vom Eisenatom koordiniert, was auf eine leichte Substitution durch das Substrat während der Katalyse schließen lässt. Der Vergleich der Eisengeometrie zwischen AcPDO, MxPDO und hETHE1 zeigt eine sehr ähnliche Eisenbindung mit identischen Orientierungen und Abständen zwischen den Bindungspartnern.

EPR-Spektroskopie der AcPDO resultierte in einer einzigen isotropen Resonanz bei  $g = 4,3$ , welche charakteristisch für ein mononukleares *high-spin* Eisenatom mit dem Ladungszustand +3 ist (Abb. 3.17 A). Nach Inkubation mit GSSH bei 40 °C kam es zu einer leichten Reduktion des Signals. Dies könnte ein Hinweis auf einen möglichen Redoxwechsel während der Katalyse sein. Zusätzlich trat eine Formänderung des negativen Absorptionsspeaks auf, was vermutlich aufgrund einer verändernden Eisengeometrie resultiert. Die genaue Ursache hierfür blieb jedoch ungeklärt. EPR-gekoppelte Redox-Titrationen zeigten, dass das Eisenzentrum ein negatives Redox-Potential besitzt, mit einem  $E_0'$  von -233,8 mV bei pH 7,5 (Abb. 3.17 BC), vergleichbar mit dem ermittelten Redoxpotential des hETHE1 mit  $E_0' = -272\text{ mV}$  (Henriques *et al.*, 2014).

UV-Vis-Spektren der AcPDO zeigten spezifische Änderungen durch die Bindung von GSSH bzw. GSH. Die Zugabe von steigenden GSSH-Konzentrationen mit anschließender spektroskopischer Messung resultierte in der Bildung von Ladungstransfer-Spezies bei 315,



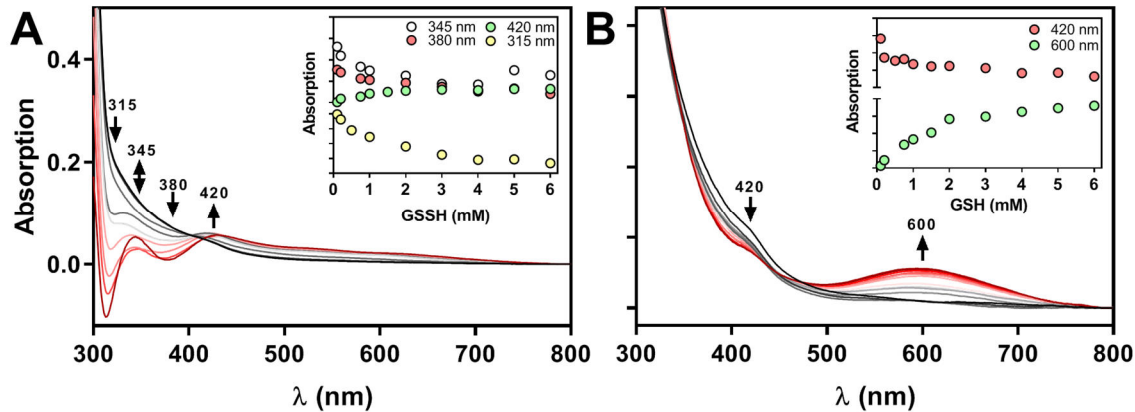
**Abbildung 3.16** | Darstellung des katalytischen Eisenzentrums der AcPDO mit seinen Liganden. **A**, Molekulare Darstellung des Eisenzentrums aus der AcPDO-Kristallstruktur. Das zentrale Eisenatom ist als braune Kugel dargestellt. **B**, Räumliche Anordnung der Eisenbindungspartner mit Bindungsabständen in Å. **C**, Darstellung der primären und sekundären Koordinationssphäre des Eisenzentrums.



**Abbildung 3.17** | EPR-Spektroskopie der AcPDO. **A**, EPR-Spektrum der nativen AcPDO und nach Inkubation mit GSSH. **B**, EPR-Spektren von Redoxitrationen der AcPDO. **C**, Normalisierte Intensitäten bei  $g = 4,3$  der EPR-Messungen aufgetragen gegen das Reduktionspotential. Die Kurve entspricht einer Nernst-Gleichung für den Übergang eines Elektrons im mononukleären Eisenzentrum der AcPDO.

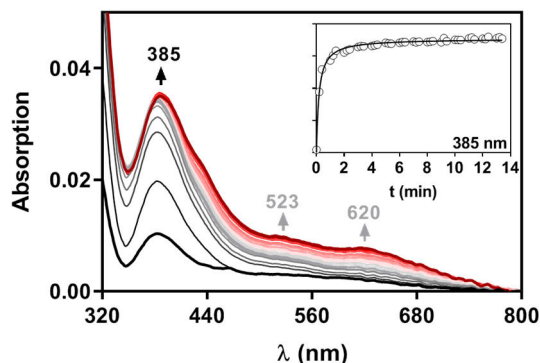
345, 380 und 430 nm (Abb. 3.18 A). Das Grundabsorptionsspektrum änderte sich dabei bis zu einer Konzentration von  $\approx 2$  mM GSSH schnell und flachte anschließend ab. In Anwesenheit von steigenden GSH-Konzentrationen kam es zu einer leichten Abnahme der Absorption bei 423 nm, wohingegen es zu einer Bildung einer deutlichen Ladungstransfer-Spezies bei 600 nm kam (Abb. 3.18 B), wie es bereits für das hETHE1 in Anwesenheit von GSH beobachtet worden war (Kabil *et al.*, 2018). Auch hier war der Effekt bis  $\approx 2$  mM GSH am stärksten ausgeprägt und flachte danach ab, was auf eine Sättigung der Bindungsstellen schließen lässt.

Mit Hilfe von *Stopped-Flow* Messungen sollte der Ladungstransfer während der Reaktion, der in den spektroskopischen Analysen beobachtet wurde, genauer analysiert werden. Hierfür wurde eine 300  $\mu$ M AcPDO- und eine anaerobe 6 mM GSSH-Lösung in gleichen Verhältnissen in eine Mischkammer gegeben und mittels eines Diodenarrays in 20 s Intervallen Absorptionsspektren aufgezeichnet. Das GSSH-Grundspektrum wurde hierfür als Hintergrund subtrahiert. In diesem Ansatz war bereits nach 20 s eine Ladungstransfer-Spezies bei 385 nm sichtbar, die sich innerhalb von 1 min deutlich steigerte und deren Ausprägung anschließend abflachte (Abb.



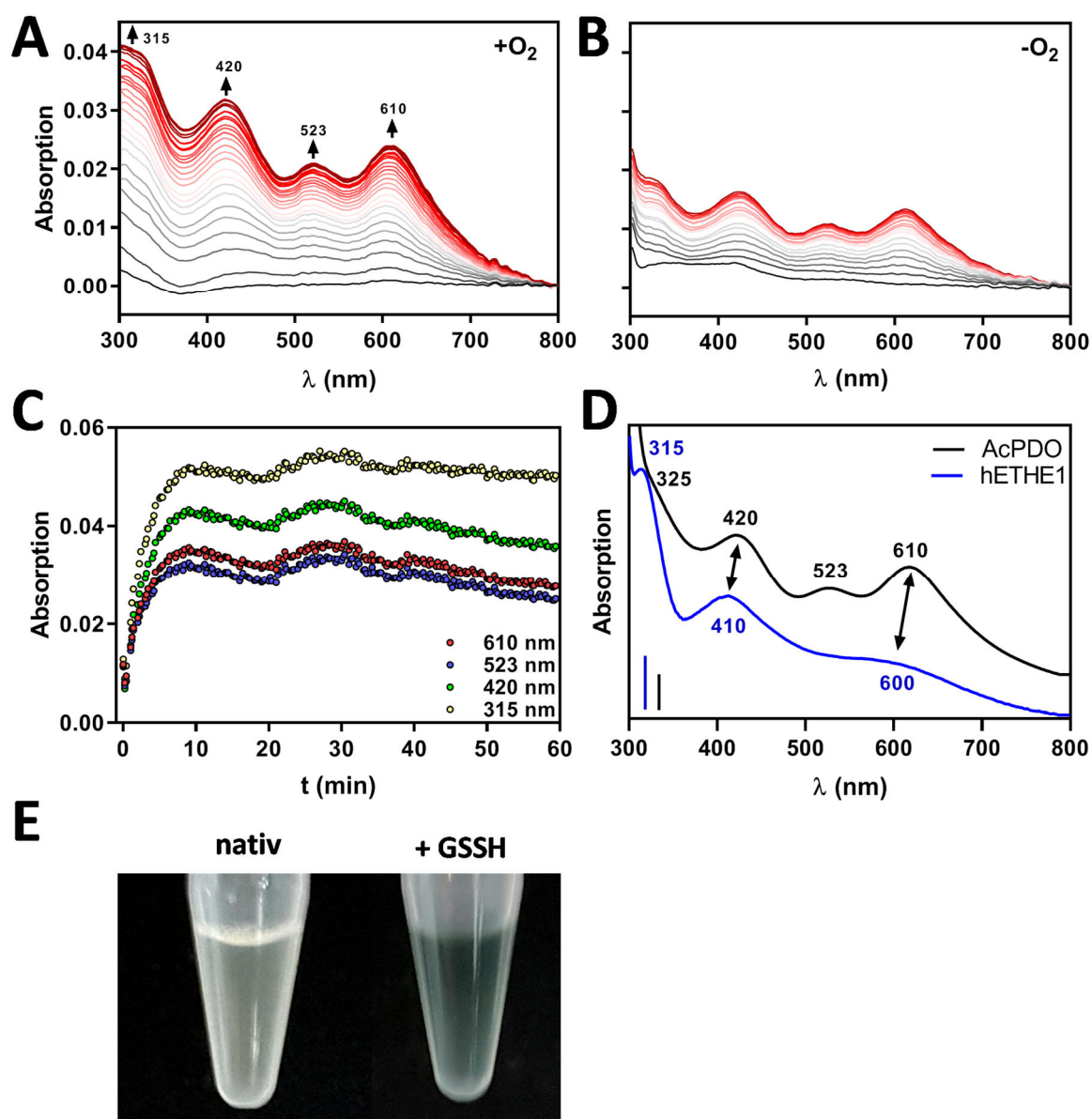
**Abbildung 3.18** | Aerobe UV-Vis-Spektren der AcPDO. **A**, UV-Vis-Spektren von 300 µM AcPDO mit steigenden GSSH-Konzentrationen. **B**, UV-Vis-Spektren von 300 µM AcPDO mit steigenden GSH-Konzentrationen. Insetts: Auftragungen der Absorptionsmaxima gegen steigende GSSH bzw. GSH-Konzentrationen.

3.19). Ebenfalls kam es zu gering ausgeprägten Ladungstransfer-Spezies bei 523 und 620 nm. Für diesen Ansatz wurde das Protein unter aeroben Bedingungen verwendet. Es war somit vermutlich bereits Sauerstoff an das Eisenzentrum gebunden, sodass es sich bei der hier vorliegenden Ladungstransfer-Spezies womöglich hauptsächlich um Elektronenübergänge zwischen Substrat und Eisenatom handelt. Die spektroskopische Messung der Sauerstoffbindung an Eisen und mögliche Ladungstransfers erfolgten mit zuvor anaerobisierter 300 µM AcPDO-Lösung, die mit ebenfalls anaerobisierter 6 mM GSSH-Lösung für ca. 2 h inkubiert wurde. Das Gemisch wurde



**Abbildung 3.19** | *Stopped-Flow* Kinetik des AcPDO Wildtyps mit GSSH. 300 µM AcPDO wurde für die Messungen ohne vorherige Anaerobisierung in der Mischkammer mit 6 mM GSSH gemischt. Das GSSH-Grundspektrum diente als Blank.

anschließend in der Mischkammer mit O<sub>2</sub>-gesättigter Puffer-Lösung (50 mM Tris/HCl, pH 7,5) gemischt. Auch hier wurde in 20 s Intervallen das Absorptionsspektrum aufgezeichnet, wobei Ladungstransfer-Spezies bei 315, 420, 523 und 610 nm auftraten (Abb. 3.20 A). Die Reaktion war innerhalb der ersten 7 min stark ausgeprägt und flachte anschließend ab (Abb. 3.20 C). Als Reagenzienleerwert diente das anaerobisierte AcPDO-GSSH-Gemisch, weshalb es sich hierbei höchstwahrscheinlich um Ladungstransfer-Spezies zwischen Sauerstoff und dem Eisenzentrum während der Katalyse handelt. Als Kontrollreaktion hierfür wurde das inerte AcPDO-GSSH-Gemisch in der Mischkammer zu zuvor anaerobisierter Pufferlösung gegeben. Auch hierbei war eine Reaktion sichtbar, die jedoch deutlich geringer ausgeprägt war als mit O<sub>2</sub>-gesättigter Pufferlösung (Abb. 3.20 B). Zurückzuführen ist dies vermutlich auf eine nicht vollständige Anaerobisierung des *Stopped-Flow*-Messsystems. Dafür spricht auch die deutlich schnellere Abflachung der Reaktion nach bereits 2 min. Vergleiche von UV-Vis-Spektren der AcPDO mit dem hETHE1 zeigten vergleichbare Ladungstransfer-Spezies im Vergleich mit den *Stopped-Flow*-Messungen, wohingegen jene des hETHE1 um ca. 10 nm verschoben waren (Abb. 3.20 D). Lediglich die Ladungstransfer-Spezies bei 523 nm wurde für



**Abbildung 3.20 | Stopped-Flow Kinetiken von zuvor anaerobisierter AcPDO mit GSSH.** **A**, UV-Vis-Spektren eines inertten AcPDO-GSSH-Gemisches, welches in der Mischkammer mit sauerstoffgesättigtem Puffer gemischt wurde. Spektren wurden in 20 s Intervallen aufgenommen. Spektren des anaerobisierten AcPDO-GSSH-Gemisches wurden als Reagenzienleerwert abgezogen. **B**, Spektren aufgenommen wie in A, jedoch mit anaerobisierten Puffer. **C**, Auftragung der Absorptionsmaxima aus A gegen die Zeit. **D**, UV-Vis-Spektren von AcPDO (300  $\mu$ M) und hETHE1 (100  $\mu$ M) nach 16-stündiger Inkubation mit jeweils 6 mM bzw. 3 mM GSSH in Anwesenheit von Sauerstoff. Die Maßstabsbalken entsprechen Absorptionen von 0,02 (hETHE1) bzw. 0,1 (AcPDO). **E**, Darstellung der isolierten nativen AcPDO (300  $\mu$ M) und nach Inkubation (> 2 h) mit 6 mM GSSH.

das hETHE1 nicht beobachtet, was womöglich auf die geringere Enzymkonzentration zurückzuführen ist. Interessanterweise trat nach längerer Inkubation der AcPDO mit GSSH ( $\geq 2$  h) eine Grünfärbung des Gemisches auf, unabhängig von der An- bzw. Abwesenheit von  $O_2$  (Abb. 3.20 E). UV-Vis-Spektren der grün gefärbten AcPDO-GSSH-Lösung ergaben

die gleichen Ladungstransfer-Spezies, wie sie zuvor in den *Stopped-Flow*-Messungen des inertten Gemisches mit  $O_2$ -gesättigter Pufferlösung beobachtet worden waren. In Anwesenheit von  $O_2$  im System war dieser Komplex länger stabil als unter Sauerstofflimitierung (ca. 16-24 h gegenüber 6 h). Wenn neuer Sauerstoff in die Lösung eingebracht wurde kam



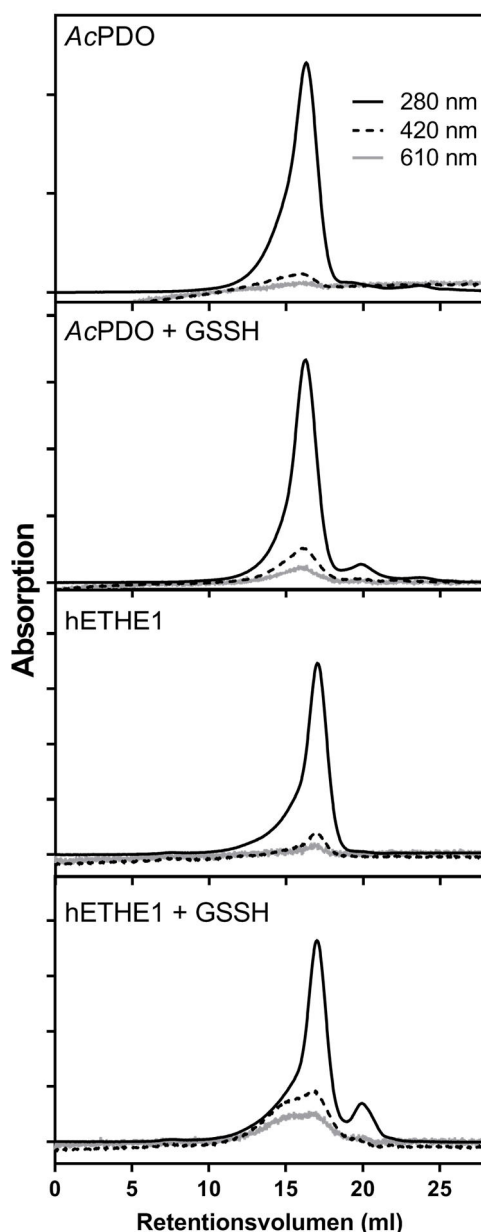
es zu einem langsamen Rückgang der Ladungstransfer-Spezies über einen Zeitraum von  $\approx 12$  h, unabhängig ob die Lösung vorher sauerstofffrei war oder nicht. Dies lässt auf eine Sättigung der Eisenzentren mit Substrat aufgrund von Sauerstofflimitierung im System oder stabilen  $O_2$ -Intermediaten schließen, die durch neuen Sauerstoffeintrag weiter reagieren.

Um zu überprüfen ob der Enzym-Substrat-Komplex bzw. der Enzym- $O_2$ -Komplex enzymgebunden ist, oder ob der Überschuss an Thiol-Gruppen das Eisen aus dem aktiven Zentrum des Enzyms herauslöst, wurde die AcPDO und das ebenfalls aus *E. coli* BL21 gereinigte hETHE1 sowohl im nativen Zustand, als auch nach Inkubation mit GSSH auf eine GPC-Säule aufgetragen und die Spektren bei 280, 420 und 610 nm aufgezeichnet. Die spezifischen Ladungstransfer-Peaks bei 420 und 610 nm eluierten in der Säulenchromatografie zur gleichen Zeit wie das jeweilige Enzym, waren also allem Anschein nach enzymgebunden vorhanden (Abb. 3.21). Der zusätzliche Peak in den Spektren bei  $\approx 20$  ml Retentionsvolumen entspricht einer molekularen Masse von 9 kDa und ist auf überschüssiges, nicht gebundenes GSSH zurückzuführen.

Es wurde somit gezeigt, dass die Eisenkoordinationssphäre der AcPDO identisch mit denen anderer Persulfid Dioxygenasen ist und man spektroskopisch Sauerstoff- bzw. Reaktionsintermediate am katalytischen Eisenzentrum nachweisen kann.

### 3.5 Mutationsanalyse des aktiven Zentrums und der sekundären Koordinationssphäre

Sequenz-Alignments aller PDO-ähnlichen Proteine, mit experimentell bestätigtem mononuklearem Eisen in ihren aktiven Zentren, zeigten, dass die sekundäre Koordinationssphäre reproduzierbar überlagert werden kann. Dies wurde bereits früher beim Vergleich zwischen PDOs und Glyoxalasen II beobachtet (Sattler *et al.*, 2015). Die PDOs mit



**Abbildung 3.21** | Gelpermeationschromatographie der AcPDO und des hETHE1 im nativen Zustand und nach Inkubation mit GSSH. Aufgetragen wurden jeweils 0,5 mg Protein, welche mit 3 mM GSSH inkubiert wurden. Für das Chromatogramm wurden die Wellenlängen 280, 420 und 610 nm parallel aufgezeichnet. Eine Einheit der y-Achse entsprechen 100 mAU.

der höchsten Strukturähnlichkeit sind die Enzyme aus *Myxococcus xanthus* (MxPDO; 59 % Sequenzähnlichkeit; PDB ID: 4YSB; Sattler *et al.* (2015)) und aus *Paraburkholderia phytofirmans* (PpPDO; 49 %; 5VE5 [in Komplex mit GSH]; Motl *et al.* (2017)). Letztere besitzt eine C-terminale Fusion einer Rhodanase-Domäne. Ehe die Röntgenkristallstruktur der

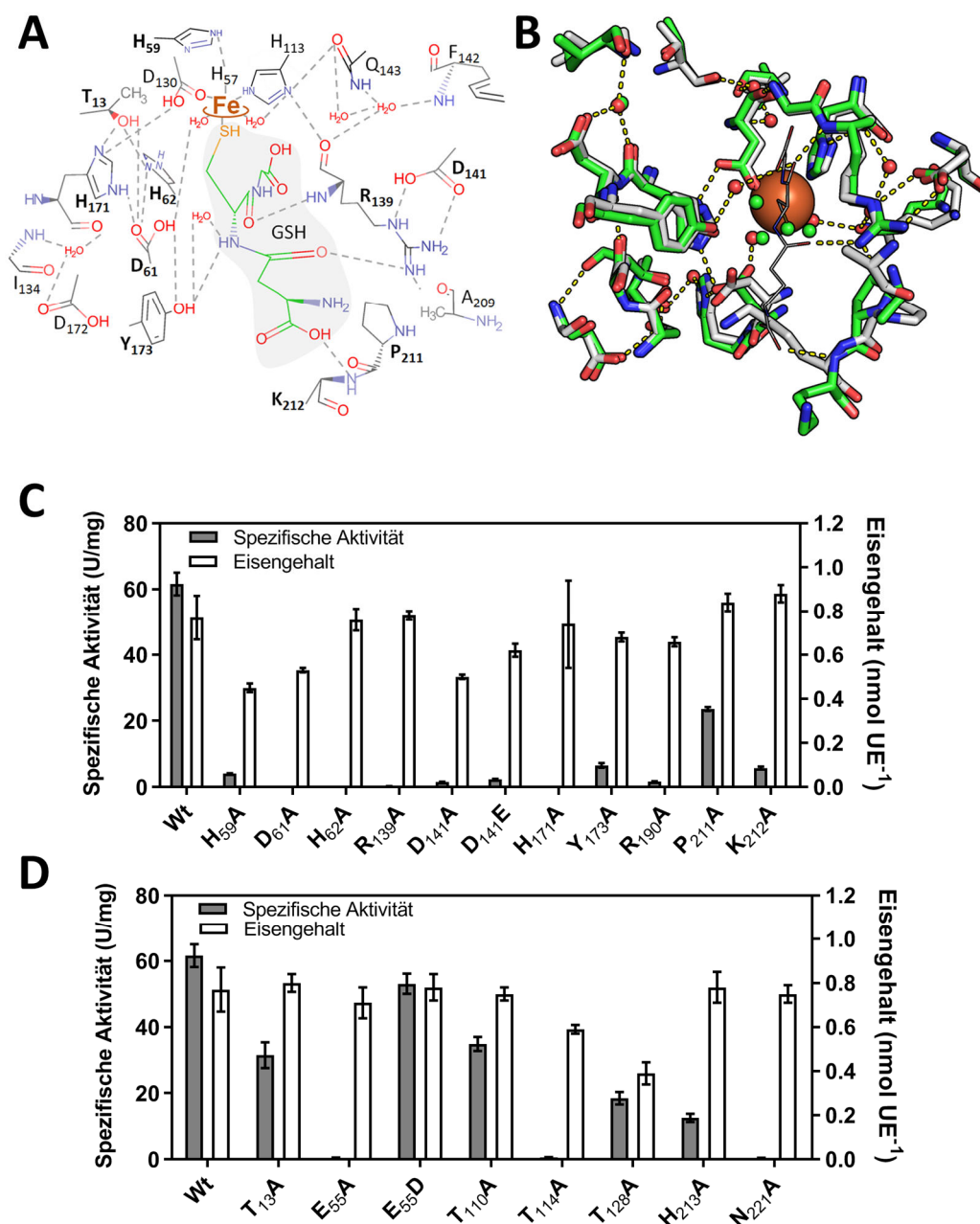
AcPDO aufgeklärt werden konnte, wurde zunächst ein Strukturmodell mit der 3D-Struktur der MxPDO als *template* erstellt. Ein Vergleich dieses Strukturmodells mit der MxPDO zeigte, dass das Modell mit einer r.m.s.d. von 0,13 Å passgenau war, während die r.m.s.d. des AcPDO Modells mit der PDO-Domäne der PpPDO 0,6 Å betrug. Diese Ähnlichkeiten entsprachen ungefähr den paarweisen Sequenzidentitäten. Die MxPDO und die PDO-Domäne der PpPDO können ebenfalls mit einem ähnlich geringen r.m.s.d. von 0,59 Å überlagert werden, sodass die GSH Koordinaten der PpPDO für die Vorhersage der GSH-bindenden Aminosäurereste und des Wasserstoffbrückennetzwerkes der AcPDO genutzt wurden. Um zu überprüfen inwiefern das erstellte 3D-Modell mit der tatsächlichen Kristallstruktur übereinstimmt, insbesondere solcher Bereiche, die für die Mutationsanalyse relevant waren, wurden auch diese Strukturen überlagert. Der Strukturvergleich resultierte ebenfalls in einer hohen Übereinstimmung der Aminosäurepositionen (r.m.s.d. 0,48 Å). Die einzige Ausnahme war die Aminosäure K<sub>212</sub>, die sich in einem kristallographisch flexiblen *loop* am Eingang des aktiven Zentrums befindet (Abb. 3.22 B; Abb. 3.23 D).

Sattler *et al.* (2015) hatten zudem eine 3D-Struktur einer TypII-PDO aus *Pseudomonas putida* mit gebundenen GSH veröffentlicht (PDB ID: 4YSL). Der Vergleich der beiden GSH-gebundenen PDOs zeigte, dass zwei der Aminosäurereste, die an der GSH-Bindung der PpPDO beteiligt sind, im *Ps. putida* Enzym nicht konserviert (R<sub>190</sub> und K<sub>212</sub>; AcPDO Nummerierung), während zwei andere konserviert sind (R<sub>139</sub> und Y<sub>173</sub>). R<sub>139</sub> befindet sich im Zentrum der Bindungstasche und dessen *backbone*-Sauerstoff ist in Wasserstoffbrückendistanz zum N $\delta$ -Atom des Eisenliganden H<sub>113</sub>. Das  $\epsilon$ - und das  $\eta$ 1-Stickstoff-Atom ist in Wasserstoffbrückendistanz zu dem Seitenketten-Carboxyl-Sauerstoff von D<sub>141</sub> (Ionenpaar) und scheint eine Wasserstoffbrücke zum *backbone*-Sauerstoff von P<sub>211</sub> zu bilden (Abb. 3.22 A). Erwartungsgemäß hatten die Varianten R<sub>139</sub>A und D<sub>141</sub>A Restaktivitäten von lediglich

0,4 bzw. 1,5 % (Abb. 3.22 C). Dies stimmt mit ähnlichen Beobachtungen von Mutationen der homologen Aminosäuren R<sub>163</sub> und D<sub>165</sub> von hETHE1 überein (Tiranti *et al.*, 2006, Henriques *et al.*, 2014). In der PpPDO bildet der Homologe R<sub>142</sub>-Aminosäurerest zusätzlich eine Wasserstoffbrücke zum  $\epsilon$ O<sub>1</sub>-Atom des Glutamyl-Anteils von GSH (Motl *et al.*, 2017). Die Substitution von AcPDO-D<sub>141</sub> zu Glutamat bewirkte lediglich eine im Vergleich zur D<sub>141</sub>A Variante geringfügig höhere Enzymaktivität (Abb. 3.22 C). Dies deutet daraufhin, dass nicht nur die ionische Wechselwirkung zu R<sub>139</sub> wichtig, sondern auch die genaue Ausrichtung der Seitenkette in der aktiven Bindungstasche für die Katalyse entscheidend ist. Ebenfalls resultierte die Enzymvariante R<sub>190</sub>A in einem deutlichen Rückgang der Enzymaktivität auf  $\approx$  2,5 % (Abb. 3.22 C). R<sub>190</sub> ist in allen TypI-PDOs, ausgenommen der aus *Halotheobacillus neapolitanus*, konserviert und befindet sich in einem kristallographisch starren *loop* am Eingang der Bindungstasche. Sein  $\eta$ 1-Stickstoff-Atom bildet eine Wasserstoffbrücke zum *backbone*-Sauerstoff von C<sub>137</sub> aus, wodurch es zentral in der Bindungstasche koordiniert wird. Der *backbone*-Stickstoff ist in Wasserstoffbrückendistanz zum O $\delta$ -Atom von N<sub>188</sub>.

Die Alanin-Varianten von Y<sub>173</sub> und K<sub>212</sub>, die ebenfalls vorhergesagte Substrat-bindende Aminosäuren darstellen, besitzen beide noch  $\approx$  10 % Enzymaktivität, wobei die der benachbarten Aminosäure P<sub>211</sub> 39 % Enzymaktivität besitzt. Die Aminosäuren P<sub>211</sub> und K<sub>212</sub> befinden sich in einem kristallographisch beweglichen *loop* im vorderen Bereich der Bindungstasche (Abb. 3.23 CD), wobei die Enzymaktivitäten der Alanin-Varianten auf eine größere Rolle von K<sub>212</sub> auf die Substratbindung hindeuten.

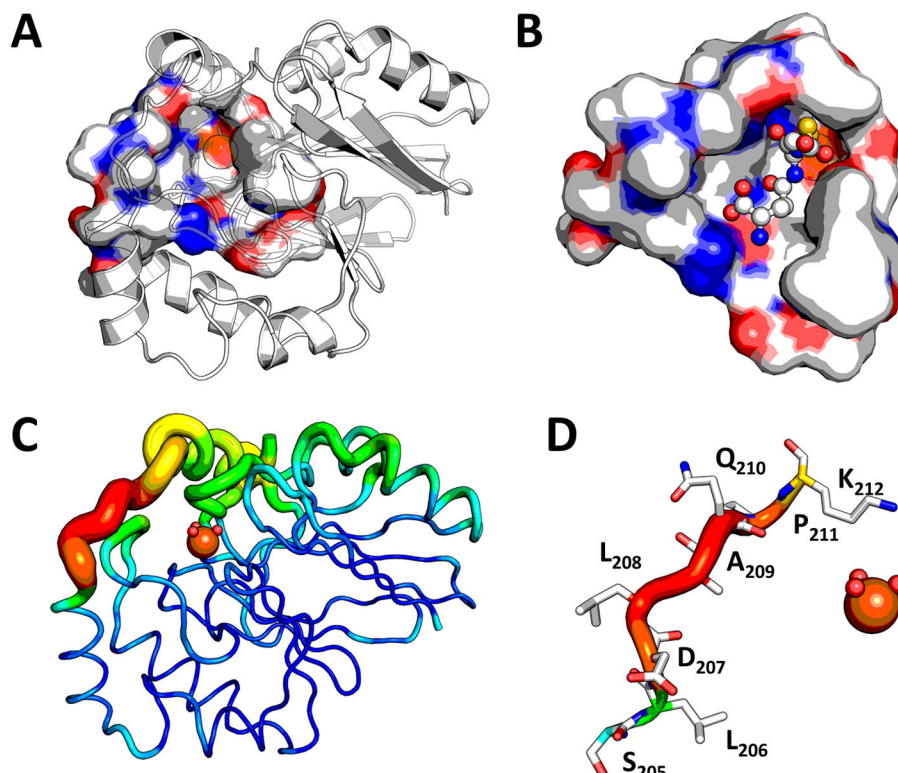
Die AcPDO besitzt ein weit gefächertes Wasserstoffbrückennetzwerk, ausgehend vom aktiven Zentrum. Die OH-Gruppe des konservierten T<sub>56</sub> bildet eine Wasserstoffbrücke zum N $\delta$ -Atom des Eisenliganden H<sub>57</sub> aus. H<sub>171</sub> ist in Wasserstoffbrückendistanz zum O $\delta$ 1-Atom des Eisenliganden D<sub>130</sub> und zu T<sub>13</sub>. Außerdem



**Abbildung 3.22** | Molekulare Darstellung des AcPDO Strukturmodells mit Vergleich zur Kristallstruktur und Mutagenese von Aminosäuren der Substratbindungstasche bzw. der sekundären Koordinationssphäre. **A**, Theoretisches Modell der GSH-Bindung an das aktive Zentrum der AcPDO mit vorhergesagten Wasserstoffbrückenbindungen. **B**, Vergleich der Aminosäuren um das aktive Zentrum zwischen Strukturmodell (grün) und Kristallstruktur (grau). **C**, Auswirkungen der Mutagenese von Aminosäuren der Substratbindungstasche. **D**, Auswirkungen der Mutagenese von Aminosäuren der sekundären Koordinationssphäre.

besitzt es eine Wasserstoffbrückenbindung zu der Carboxylgruppen von D<sub>61</sub>, welche wiederum in Wasserstoffbrückendistanz zu H<sub>62</sub> und einem Eisen-kordinierenden Wassermolekül ist (Abb. 3.2 A). Das Wassermolekül wird zusätzlich vom N $\delta_1$ -Atom der Aminosäure H<sub>59</sub> koordiniert, welche in einem Abstand von 3.9 Å parallel zu H<sub>62</sub> steht und Wasserstoffbrü-

cken zu D<sub>30</sub> und dem Eisen-kordinierenden H<sub>57</sub> ausbildet. Die H<sub>59</sub>A Variante hatte eine verbleibende Aktivität von 6,6 %, wobei die T<sub>56</sub>A Variante nicht gereinigt werden konnte und auch kein Protein in SDS- und Western-Analysen der Expressionskultur sichtbar war. H<sub>171</sub>A, H<sub>62</sub>A und D<sub>61</sub>A wurden in *E. coli* produziert, zeigten aber keine Enzymaktivität ober-



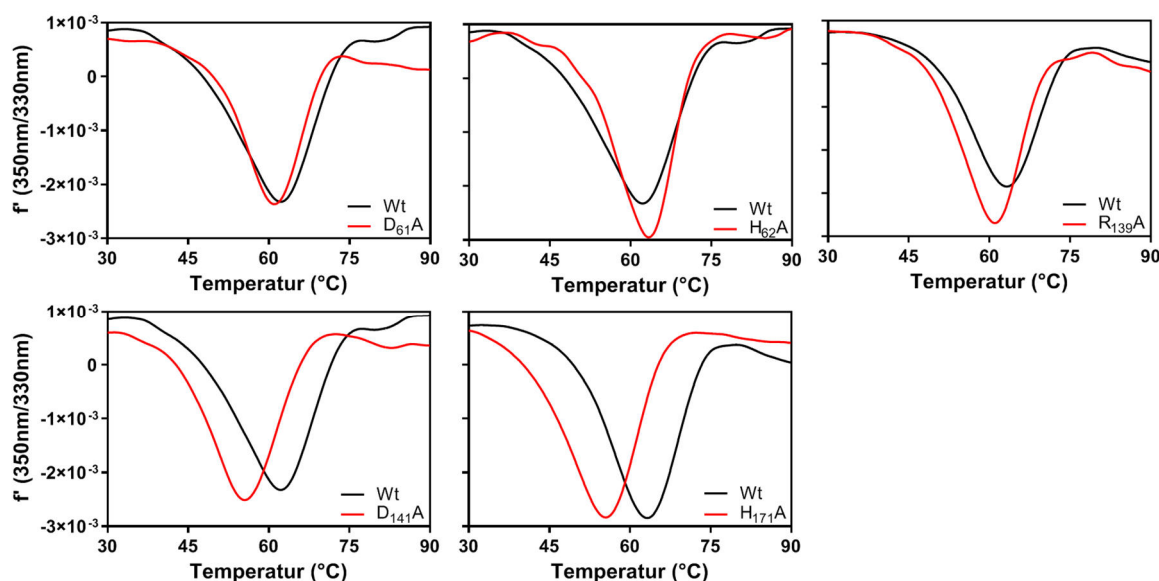
**Abbildung 3.23** | Darstellung der AcPDO Substratbindungstasche und kristallographisch flexibler Bereiche. **A**, Substratbindungstasche einer Enzymuntereinheit der AcPDO. **B**, Substratbindungstasche mit modelliertem GSSH. **C**, Darstellung von kristallographisch flexiblen (rot) und starren (blau) Regionen einer AcPDO Untereinheit. **D**, Aminosäurezusammensetzung des kristallographisch flexiblen loops an der Substratbindungstasche der AcPDO.

halb der Detektionsgrenze ( $\leq 0,05$  U/mg Protein, mit  $100 \mu\text{g/ml}$  Enzym im Enzymtestansatz). Diese Beobachtung passt zu der Position der Aminosäuren, die sich in zwei loops im aktiven Zentrum in unmittelbarer Nähe zum Eisenatom befinden und eine zentrale Rolle im Wasserstoffbrückennetzwerk einnehmen.

Das erweiterte Wasserstoffbrückennetzwerk um das aktive Zentrum wird von überdurchschnittlich vielen Threonin-Resten gebildet. Die OH-Gruppe von T<sub>13</sub> ist in Wasserstoffbrückendistanz zum N<sub>ε1</sub>-Atom von H<sub>171</sub>. T<sub>110</sub> bildet Wasserstoffbrücken zu dem Aminosäurerest von S<sub>119</sub> aus und T<sub>114</sub> ist in Wasserstoffbrückendistanz zum Eisen-koordinierenden backbone von H<sub>113</sub>. T<sub>128</sub> ist ebenfalls in Wasserstoffbrückendistanz zu einem Eisen-koordinierenden backbone von D<sub>130</sub> (Abb. 3.22 A). Die Aktivität der Varianten T<sub>13</sub>A und T<sub>110</sub>A waren mit  $> 50\%$  Restaktivität nur geringfügig

beeinflusst (Abb. 3.22 D). Die Variante T<sub>128</sub>A hatte noch  $\approx 30\%$ , T<sub>114</sub>A lediglich  $\approx 1\%$  Restaktivität bei einem verringerten Eiseneinbau verglichen mit dem Wildtyp-Enzym (Abb. 3.20 D). Beide befinden sich in einem loop, in dem sich auch jeweils ein Eisenligand befindet, und stabilisieren diesen womöglich durch Wasserstoffbrücken zu den jeweiligen Eisenliganden. Insbesondere T<sub>114</sub> scheint hierbei eine wichtige Rolle einzunehmen.

Eine weitere wichtige Funktion nimmt vermutlich E<sub>55</sub> ein. Das O<sub>ε1</sub>-Atom ist in Wasserstoffbrücken-Distanz zum N<sub>ε2</sub>-Atom von H<sub>59</sub> und stabilisiert den loop im aktiven Zentrum, in dem sich die essentiellen Aminosäuren D<sub>61</sub> und H<sub>62</sub> befinden. In der E<sub>55</sub>A Variante reduzierte sich die Enzymaktivität auf  $\approx 0,8\%$ , konnte jedoch durch das Einbringen eines Aspartat-Restes auf  $\approx 86\%$  wiederhergestellt werden (Abb. 3.22 D). Dies legt nahe, dass die Ausrichtung des loops wichtig zu sein scheint,



**Abbildung 3.24** | Auftragung der ersten Ableitung der *Differential Scanning Fluorimetry* von AcPDO Varianten (jeweils 1 mg/ml) in 100 mM Tris/HCl-Puffer, pH 8,0 bei einer Heizrate von 1 K min<sup>-1</sup> jeweils im Vergleich zum Wildtyp-Enzym.

da dessen Delokalisation durch das Entfernen koordinierender Aminosäurereste einen rapiden Abfall der Enzymaktivität bewirkt. Ebenso besitzt die N<sub>221</sub>A Variante einen stark verringerte Enzymaktivität von  $\approx 0,7\%$  (Abb. 3.22 D). N<sub>221</sub> befindet sich in einer  $\alpha$ -Helix an der äußeren Enzymoberfläche auf der gegenüberliegenden Seite der Bindungstasche und bildet Wasserstoffbrücken zu den *backbone*-Stickstoffen von H<sub>59</sub> und H<sub>62</sub> und zum *backbone*-Sauerstoff von I<sub>63</sub> aus, welches sich ebenfalls in dem erweiterten *loop* des aktiven Zentrums befindet. Somit nimmt N<sub>221</sub>, übereinstimmend mit den Aktivitätsmessungen der Alanin-Variante, eine zentrale Rolle in der Koordination des essentiellen *loops* in direkter Eisenumgebung des aktiven Zentrums ein. H<sub>213</sub> befindet sich am Ende der  $\alpha$ -Helix, in der auch N<sub>221</sub> liegt, und ist in erweiterter Wasserstoffbrückendistanz (3,4 Å) zum D<sub>61</sub>-*backbone*. Die H<sub>213</sub>A Variante besitzt eine Restaktivität von  $\approx 20\%$  (Abb. 3.22 D), sodass eine zentrale Funktion in der *loop*-Stabilisierung, wie es bei N<sub>221</sub> der Fall ist, unwahrscheinlich erscheint.

Um Rückschlüsse auf Veränderungen der Enzymstabilität durch die vorgenommenen Aminosäureaustausche zu ziehen, wurden

Alanin-Varianten von Aminosäuren mit stark verringerter Enzymaktivität mittels *Differential scanning fluorimetry* (DSF) im Hinblick auf ihre Thermostabilität untersucht (Abb. 3.24). Die enzymatisch inaktiven Varianten D<sub>61</sub>A und H<sub>62</sub>A zeigten keinerlei Veränderungen ihrer Schmelzpunkte, verglichen mit dem Wildtyp-Enzym. Im Gegensatz dazu wiesen die Varianten R<sub>139</sub>A, D<sub>141</sub>A und H<sub>171</sub>A, die enzymatisch eine geringe Aktivität besaßen, eine Verringerung ihrer Schmelzpunkte auf jeweils  $60,7 \pm 0,8\text{ °C}$ ,  $55,7 \pm 0,2\text{ °C}$  und  $54,9 \pm 0,7\text{ °C}$  auf. Dies deutet darauf hin, dass die Ionenpaarbindung (Salzbrücke) zwischen R<sub>139</sub> und D<sub>141</sub> wichtig für die Stabilität und die Wasserstoffbrückenbindung zu H<sub>171</sub> ist.

### 3.6 Substratbindungsanalysen

Die Bestimmung von Dissoziationskonstanten ( $K_D$ ) erfolgte mittels *Microscale Thermophoresis* (MST)-Messungen. Hierbei macht man sich zu Nutze, dass sich Moleküle entlang eines Temperaturgradienten zu den Bereichen mit niedrigerer Umgebungstemperatur bewegen. Diese Migration wird mittels eines Enzym-gekoppelten Fluoreszenzfarbstoffes nachgewiesen, wobei Substratgebundene



**Tabelle 3.2** | Übersicht der Bindungskonstanten des AcPDO Wildtyps und von AcPDO Varianten; n = 6 für AcPDO mit GSSH, ansonsten n = 3.

Substrat	Enzym	K <sub>D</sub> -Wert
GSSH	AcPDO-Wt	2,0 ± 0,2 mM
	AcPDO-Wt	113 ± 6 μM
	D <sub>61</sub> A	407 ± 23 μM
	R <sub>139</sub> A	<sup>1</sup>
	H <sub>171</sub> A	378 ± 12 μM

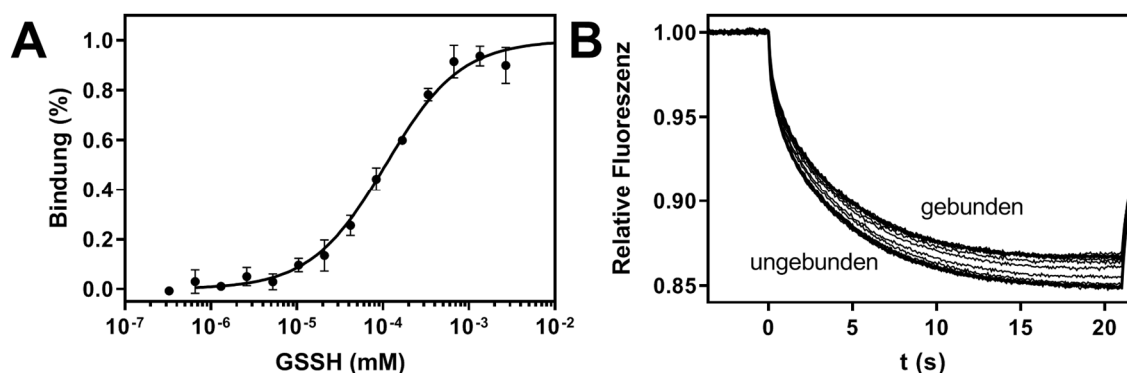
<sup>1</sup> keine Substratbindung detektierbar.

Proteinkomplexe langsamer entlang des Gradienten wandern als die jeweilige native Form des Enzyms.

Die AcPDO wurde fluoreszenzmarkiert und das MST-Signal anschließend mit GSSH und GSH-Konzentrationen zwischen 0,33 μM und 2,69 mM bzw. zwischen 5,08 μM und 5,2 mM aufgezeichnet. Für den AcPDO Wildtyp mit GSSH ergab sich ein K<sub>D</sub>-Wert von 113 ± 6 μM (Abb. 3.25, Tab. 3.2). Messungen mit GSH resultierten in einem ca. 17-fach höheren K<sub>D</sub>-Wert von 2,0 ± 0,2 mM (Tab. 3.2). Für die Enzymvarianten D<sub>61</sub>A, R<sub>139</sub>A und H<sub>171</sub>A wurden ebenfalls K<sub>D</sub>-Werte in Anwesenheit von GSSH ermittelt. Diese ergaben für die Varianten D<sub>61</sub>A und H<sub>171</sub>A, die einen kompletten Verlust der Enzymaktivität zur Folge hatten, K<sub>D</sub>-Werte von 407 ± 23 μM, bzw. 378 ± 12 μM und sind somit ca. viermal höher als die des AcPDO Wildtyps (Tab. 3.2). Für die Variante

R<sub>139</sub>A wurde keine Bindung des Substrates beobachtet, was darauf hindeutet, dass R<sub>139</sub> eine zentrale Rolle in der Substratbindung und -orientierung in der Bindungstasche einnimmt, korrelierend mit der geringen Enzymaktivität der Alanin-Variante.

Molekulare Dockinganalysen mit GSSH und der Röntgenkristallstruktur der AcPDO unterstützen die biochemisch erhobenen Daten. So besitzt die R<sub>139</sub>A Variante mit einem ΔG von -4,8 kcal mol<sup>-1</sup> thermodynamisch die höchste freie Enthalpie (Tab. 3.3), was auf eine geringe Bindungswahrscheinlichkeit des Substrates schließen lässt. Der AcPDO Wildtyp hingegen besitzt für GSSH ein ΔG von -32,3 kcal mol<sup>-1</sup> für die Fe<sup>2+</sup>- bzw. -38,6 kcal mol<sup>-1</sup> für die Fe<sup>3+</sup>-Bindung und für die GSH-Bindung von -28,8 kcal mol<sup>-1</sup> für Fe<sup>2+</sup> bzw. -37,7 kcal mol<sup>-1</sup> für Fe<sup>3+</sup> (Tab. 3.3). Die Bindung an Fe<sup>2+</sup> ist demnach für GSSH deutlich günstiger als für GSH, während die Bindung an Fe<sup>3+</sup> eine vergleichbare Gibbs-Energiedifferenz besitzt. Auch die freie Enthalpie der Varianten D<sub>61</sub>A, H<sub>62</sub>A und H<sub>171</sub>A mit GSSH zeigen keine signifikant geringeren Bindungsenergien, lediglich die Variante R<sub>190</sub>A, die ebenfalls eine stark verringerte Enzymaktivität aufwies, zeigt mit einem ΔG von -23,3 kcal mol<sup>-1</sup> eine ca. 10 kcal mol<sup>-1</sup> herabgesetzte freie Enthalpie, verglichen mit dem AcPDO Wildtyp mit GSSH.



**Abbildung 3.25** | Bestimmung der GSSH-Bindungskonstante des AcPDO-Wildtyps. **A**, Auftragung des normierten Anteils an gebundenem Enzym gegen steigende GSSH-Konzentrationen. 100 % entsprechen dabei einem vollständig gesättigten Enzym. Messungen wurden in Triplikaten durchgeführt. **B**, Exemplarische Darstellung der Thermophoresekurven des Fluoreszenz-markierten AcPDO-Wt in Anwesenheit von steigenden GSSH-Konzentrationen.

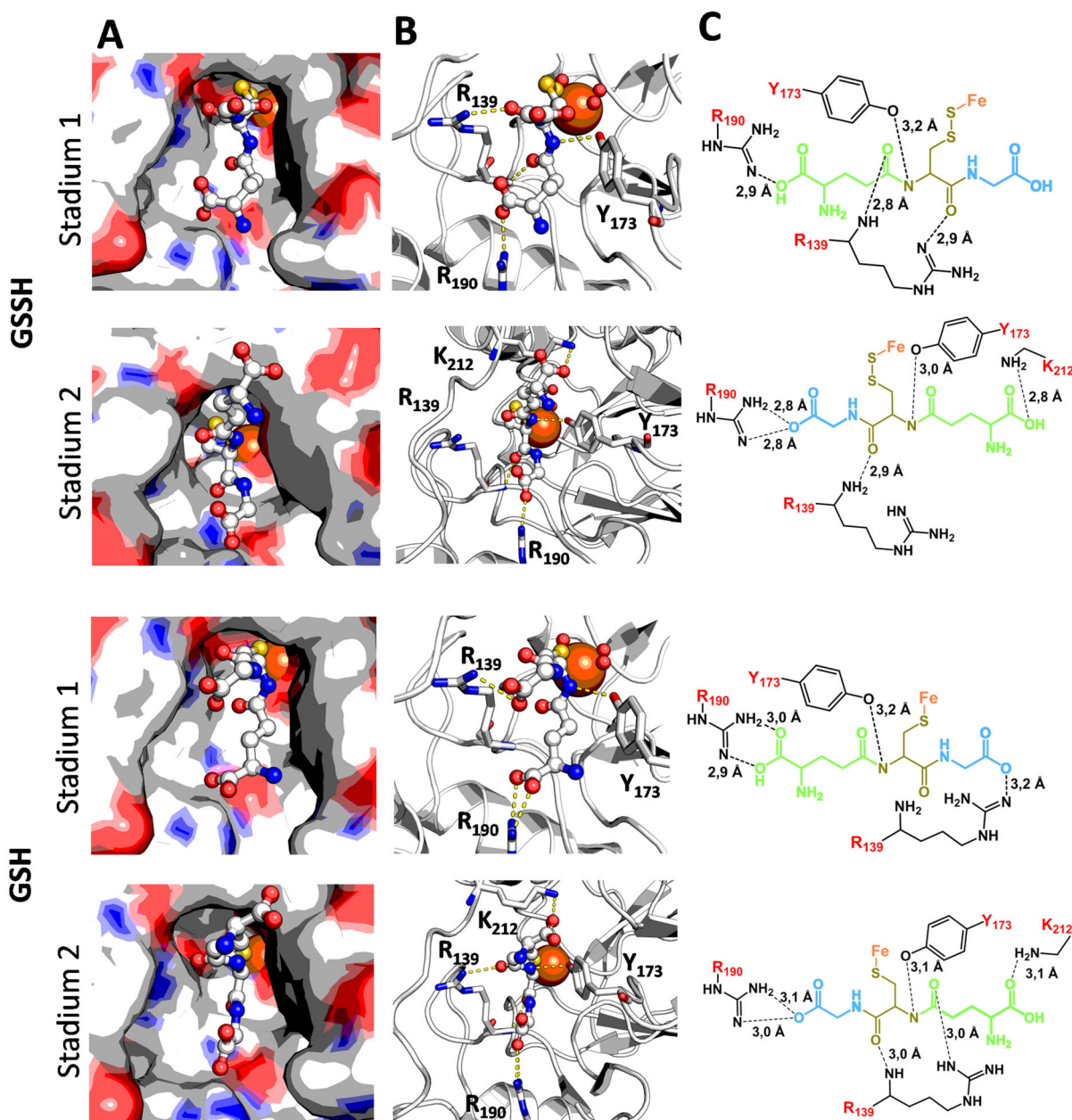
**Tabelle 3.3** | Übersicht der kalkulierten freien Enthalpie des AcPDO Wildtyps und von AcPDO Varianten mit Produkt und Substrat.

		Wt	D <sub>61</sub> A	H <sub>62</sub> A	R <sub>139</sub> A	H <sub>171</sub> A	R <sub>190</sub> A
		$\Delta G$ (kcal mol <sup>-1</sup> )					
Fe <sup>2+</sup>	GSH	-28,8	<sup>1</sup>	-	-	-	-
	GSSH	-32,2	-43,7	-33,5	-4,8	-28,9	-23,3
Fe <sup>3+</sup>	GSH	-37,7	-	-	-	-	-
	GSSH	-38,6	-43,2	-37,9	-9,3	-36,8	-32,2

<sup>1</sup> nicht bestimmt.

Strukturell zeigte das daraus abgeleitete Bindungsmodell für die AcPDO, sowohl für GSSH- als auch GSH-Bindungen, zwei verschiedenen Bindungsstadien, in denen jeweils die Position des GS(S)H- $\gamma$ -Glutamyl und des -Glycyl-Anteils um 180° um das Cystein- $\alpha$ -Atom rotiert ist (Abb. 3.26; Stadium 1 und 2). Hauptunterschied der beiden Bindungszustände ist die Interaktion der Carboxylgruppe des Glutamyl-Anteils mit R<sub>190</sub> in Stadium 1, wohingegen R<sub>190</sub> in Stadium 2 lediglich mit einem der beiden Sauerstoffe des Glycin-Carboxylgruppe interagiert. Stadium 2 zeigt dafür zusätzlich die Beteiligung von K<sub>212</sub> an der GS(S)H-Bindung, welches sich in Wasserstoffbrückendistanz zu einem der beiden Sauerstoffe des Glutamat-Anteils befindet. Insgesamt wurden in den molekularen Docking-Analysen 15 verschiedene GSSH-Bindungszustände ermittelt, wobei acht Stadium 1 und sieben Stadium 2 entsprachen. Die durchschnittlichen  $\Delta G$ -Werte betrugen für Stadium 1 -37,5 kcal mol<sup>-1</sup> und für Stadium 2 -39,8 kcal mol<sup>-1</sup>, mit der jeweils energetisch günstigsten Bindung von -43,7 kcal mol<sup>-1</sup> bzw. -43,3 kcal mol<sup>-1</sup>. Energetisch scheint demnach keines der beiden Stadien die GSSH-Bindung zu begünstigen, sodass man von einer flexiblen Orientierung des Glycin- bzw. Glutamat-Anteils von GSSH während der Katalyse ausgehen könnte. Vergleicht man jedoch die Interaktionen mit den Aminosäuren der Bindungstasche wird deutlich, dass in Stadium 1 mehr Wasserstoffbrückenbindungen zwischen GSSH und R<sub>190</sub> und R<sub>139</sub> ausgebildet werden. Beides stellen Aminosäuren dar, die wichtig für die Katalyse zu sein scheinen, da

deren Substitution einen fast vollständigen Verlust der Enzymaktivität bewirkte (vgl. Abb. 3.22). Insbesondere R<sub>139</sub> besitzt in Stadium 2 nur eine *backbone*-Interaktion mit dem Substrat, die auch in der R<sub>139</sub>A-Variante weiterhin Bestand haben dürfte. Die zuvor ermittelten Bindungskonstanten (Tab. 3.2) deuten jedoch darauf hin, dass in der entsprechenden R<sub>139</sub>A-Enzymvariante keine Substratbindung mehr möglich ist, bzw. diese sich unterhalb der Detektionsgrenze befindet, sodass es wahrscheinlich erscheint, dass GSSH für die Katalyse in Bindungsstadium 1 vorliegen muss. Vergleichbares gilt für die GSH-Bindung, welches sich in beiden Bindungsstadien sowohl in der Orientierung der GSH-Anteile als auch der Beteiligung der Wasserstoffbrücken-ausbildenden Aminosäuren ähneln. Insgesamt wurden für die GSH-Bindung 38 verschiedene Bindungskonformationen identifiziert, von denen 37 Stadium 1 und nur eine Stadium 2 entsprachen. Aufgrund des fehlenden Persulfidanteils und des daraus resultierenden geringeren Abstandes zum Eisen kommt es allerdings lediglich in Bindungsstadium 2 zu einer Interaktion der R<sub>139</sub>-Seitenkette mit GSH, sodass jenes für den Fall einer Bindung wahrscheinlicher erscheint als Stadium 1 (analog zur GSSH-Bindung). Die Orientierung der GSH-Anteile in Stadium 2 entspricht der strukturell sichtbaren Orientierung der PDOs aus *Paraburkholderia phytofirmans* und *Pseudomonas putida* (Sattler *et al.*, 2015, Motl *et al.*, 2017). Es erscheint daher denkbar, dass die Orientierung des Glycin- und des Glutamat-Anteils, wie man sie in den Röntgenkristallstrukturen sieht, lediglich für

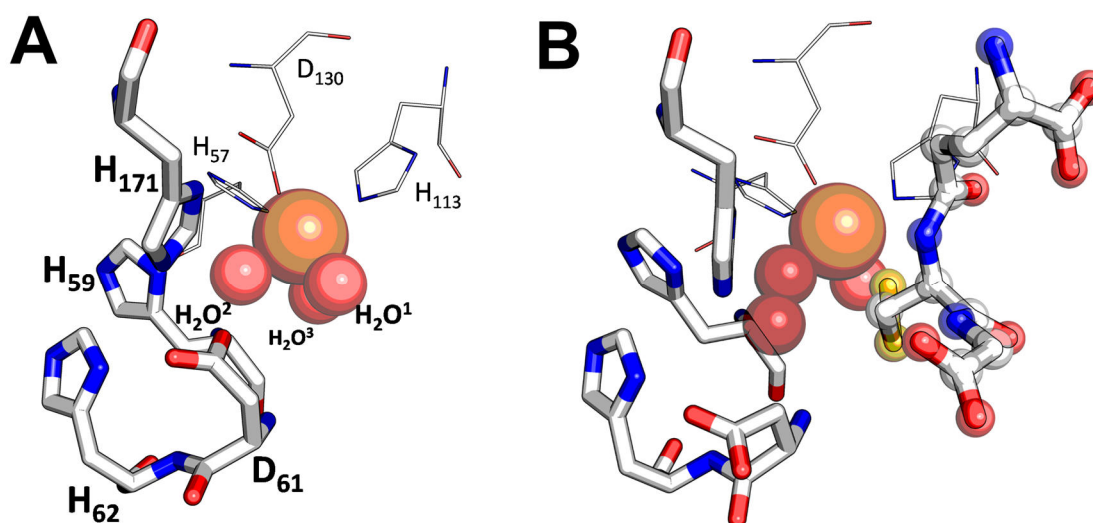


**Abbildung 3.26** | Modellierung der GSSH- und GSH-Bindung an das aktive Zentrum der AcPDO ausgehend von molekularen Docking-Berechnungen mit jeweils zwei möglichen Bindungsstadien. **A** Modelle der GS(S)H-Bindung in der Bindungstasche. **B**, GS(S)H-Bindung mit eingezeichneten Wasserstoffbrücken zu Aminosäuren in der Bindungstasche. **C**, Molekulare Darstellung der GS(S)H-Bindung. Der GS(S)H-Glutamat-Anteil ist jeweils grün, der -Glycin-Anteil blau dargestellt.

die GSH-Bindung beobachtet werden kann und die GSSH-Bindung eine davon abweichende Orientierung einnimmt, in der die Positionen der Glutamyl- und Glycin-Anteile vertauscht sind. Insgesamt wird jedoch deutlich, dass R<sub>139</sub> eine zentrale Rolle in der Substratbindung einnimmt und zusammen mit R<sub>190</sub> und Y<sub>173</sub> die Koordination von GS(S)H in der Bindungstasche übernimmt. Der Bindungswinkel des Fe-S-S-Komplexes beträgt dabei im

vermutlich bindingsrelevanten Stadium 1 für GSSH 143,0°. In einer weiteren Möglichkeit der Persulfidbindung an das katalytische Eisenzentrum, ebenfalls in Stadium 1, beträgt der Bindungswinkel 73,4°, wobei in diesem Fall beide Schwefelatome an das Eisen gebunden sind, sodass dieser Zustand möglicherweise ein Reaktionsintermediat darstellen könnte (s. Anhang, Abb. S-3.4).





**Abbildung 3.27** | Aktives Zentrum der AcPDO mit modellierten GSSH und Superoxid nach Energieminimierung. **A**, Native AcPDO-Struktur mit Eisenliganden und essentiellen Aminosäuren. **B**, AcPDO-Struktur nach Modellierung und Energieminimierung mit GSSH und Superoxid (dunkelrote Kugeln).

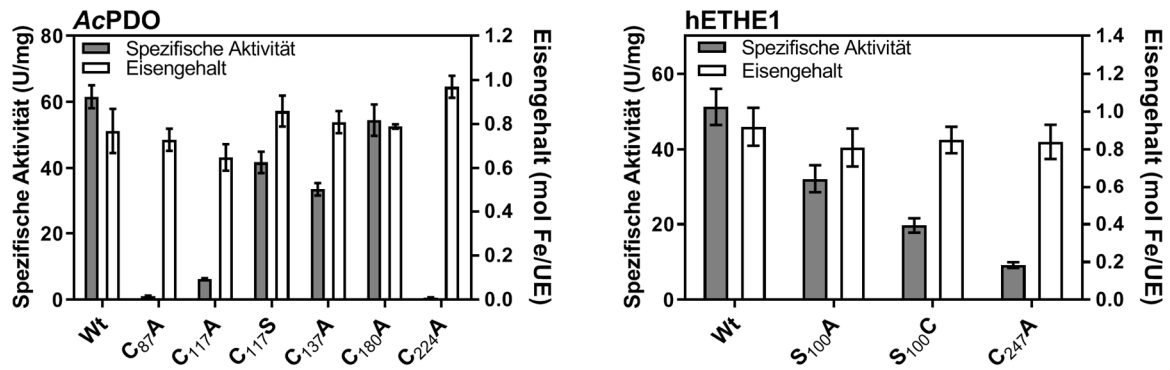
Interessanterweise klappt der Aminosäurerest des essentiellen und konservierten D<sub>61</sub> nach Energieminimierung der GSSH-gebundenen Struktur um 90° um (Abb. 3.27). Das zentrale, Eisen-koordinierende Wasser H<sub>2</sub>O<sup>1</sup> begibt sich stattdessen in unmittelbare räumliche Nähe zu dem Eisen-koordinierenden Wasseratom H<sub>2</sub>O<sup>2</sup> und kann demnach als Superoxid modelliert werden (Bindungsabstand 1,5 Å), wobei sich das ebenfalls essentielle H<sub>171</sub> mit seinem aromatischen Aminosäurerest parallel zum Superoxid ausrichtet. Folglich ist es wahrscheinlich, dass die energieminierte, substratgebundene Form der AcPDO mit dem Superoxid einen möglichen Übergangszustand der Enzymreaktion darstellt.

Die Kalkulation der Bindung von GSH ist mit einem  $\Delta G$  von  $-28,8 \text{ kcal mol}^{-1}$  energetisch ungünstiger, vor allem durch den Verlust der Wasserstoffbrückeninteraktion des backbone-Stickstoffes von R<sub>139</sub> zum Sauerstoff des Glutamyl-Anteils von GSH (Abb. 3.26). Entsprechend ergibt sich daraus, dass die Bindung des Substrates thermodynamisch günstiger zu sein scheint als die des Produktes, zumindest im reduzierten Zustand des Eisenzentrums.

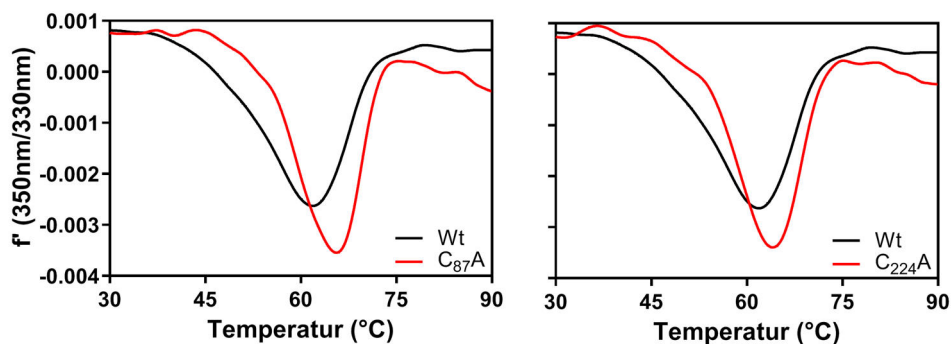
Der Fe-S-Bindungswinkel beträgt, ähnlich zu dem der GSSH-Bindung, 141,1°.

### 3.7 Disulfidbrücke und Cystein-Modifikationen

PDO-Sequenz-Alignments zeigen, dass Cystein-Reste in ihrer Anzahl in verschiedenen PDOs variieren und dass sie nicht generell konserviert sind, nicht einmal das essentielle C<sub>247</sub>/C<sub>235</sub> in hETHE1 bzw. in der PDO aus *Arabidopsis thaliana*, welche in den 3D Strukturen zu Cysteinsulfinsäure modifiziert sind (McCoy *et al.*, 2006b, Sattler *et al.*, 2015, Jung *et al.*, 2016). Die AcPDO besitzt insgesamt fünf Cystein-Reste. Zwei davon (C<sub>87</sub> und C<sub>224</sub>) befinden sich laut Strukturvorhersage in unmittelbarer räumlicher Nähe an der Proteinoberfläche. In der MxPDO befinden sich die entsprechenden Cysteine C<sub>86</sub> und C<sub>223</sub> ebenfalls nicht weit voneinander entfernt mit einem Abstand von 3,5 Å, was zu weit für eine Disulfidbrücke ist (2 – 2,1 Å) (Sattler *et al.*, 2015). Auch in der 3D Struktur und der Elektronendichtekarte gibt es keine Belege für eine direkte Interaktion. Getrennte Mutagenese



**Abbildung 3.28** | Auswirkungen ortsgerichteter Mutagenesen im *pdo* Gen von *At. caldus* (Cystein-Varianten) und komplementäre Mutationen im humanen *ethe1* Gen.



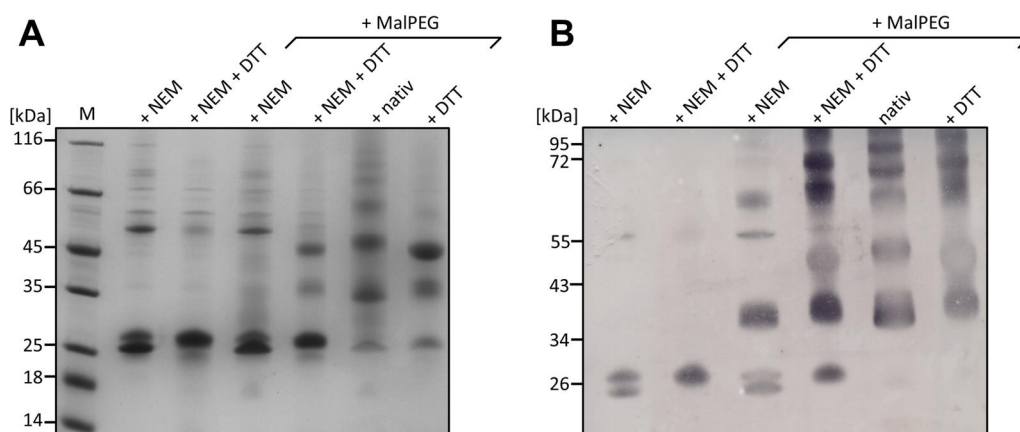
**Abbildung 3.29** | Auftragung der ersten Ableitung der *Differential Scanning Fluorimetry* von Cystein-Varianten der AcPDO (jeweils 1 mg/ml) in 100 mM Tris/HCl-Puffer, pH 8,0 bei einer Heizrate von 1 K min<sup>-1</sup> jeweils im Vergleich zum Wildtyp-Enzym.

der beiden AcPDO-Cysteine zu Alanin resultierte in einem fast kompletten Verlust der Enzymaktivität (2,2 bzw. 1,3 % Restaktivität verglichen mit dem Wildtyp; Abb. 3.28).

DSF-Messungen der beiden AcPDO C<sub>87</sub>A und C<sub>224</sub>A Varianten resultierten in Schmelzpunkten von  $63,3 \pm 1,4$  °C bzw.  $63,3 \pm 0,05$  °C und zeigten, dass die Gesamtstabilität des Proteins nicht beeinflusst ist (Abb. 3.29).

Gel-Shift-Assays mit der nativen AcPDO und nach Behandlung mit NEM zeigten, neben der Dimerbande bei  $\approx 54$  kDa, zwei Monomer-Banden mit apparenten molekularen Massen von 26 – 28 kDa in Coomassie-gefärbten SDS-Polyacrylamidgelen und in Western-Analysen mit  $\alpha$ -Strep-Tag Antikörpern (Abb. 3.30). Die kleinere der beiden Banden war nach Reduktion des AcPDO-Wildtyps mit DTT im Auftragspuffer nicht mehr vorhanden, ebenso wenig wie in den C<sub>87</sub>A und C<sub>224</sub>A Varianten mit oder ohne Reduktion (s. Anhang;

Abb. S-3.1) und während der routinemäßigen SDS-PAGE mit reduzierenden SDS-Auftragspuffern. Dies deutet darauf hin, dass das nicht reduzierte Protein zwei Monomer-Konformationen annimmt, die unterschiedlich in der SDS-PAGE migrieren. Die kleinere Bande war im nicht reduzierten Wildtyp-Enzym nach Inkubation mit Methoxypolyethylenglykol Maleimid-5000 (MalPEG) sichtbar, jedoch nicht in den beiden Cystein-Varianten, was auf einen Schutz vor PEGylierung hindeuten könnte. Bis zu fünf Banden mit höheren molekularen Massen waren nach MalPEG-Derivatisierung vorhanden, welche alle eine Veränderung von  $\approx 10$  kDa aufwiesen und was auf eine, zumindest teilweise, PEGylierung aller fünf Cystein-Reste schließen lässt (die Verschiebung um 10 kDa ist typisch für MalPEG-5 000-behandelte Proteine in Tris-Tricin-Gelen; Venceslau *et al.* (2013)). Es traten ebenfalls kleine, aber konsistente Änderungen der



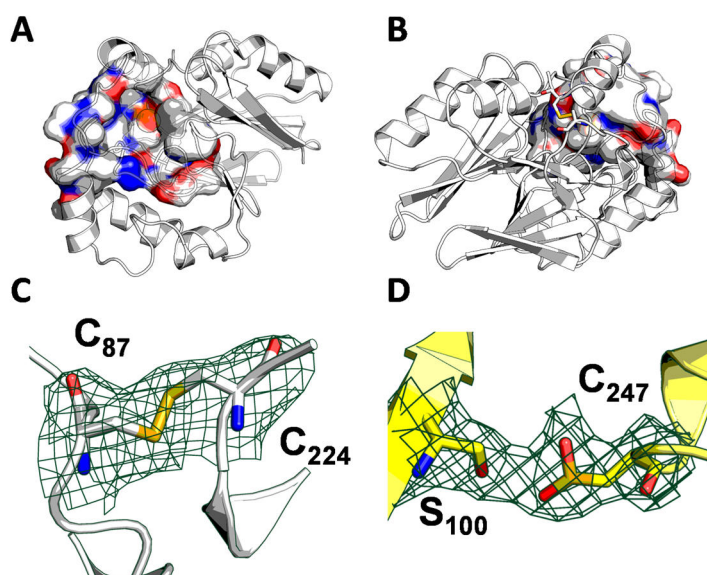
**Abbildung 3.30** | Analyse der AcPDO mittels eines MalPEG Gel Shift Assays. **A**, Coomassie-gefärbtes 10 % Tris-Tricin Polyacrylamidgel des AcPDO-Wildtyps (10 µg/Spur). **B**, Western-Analyse mittels eines StrepMap-Classic HRP-gekoppelten Antikörpers. M, Markerproteine in Kilodalton; NEM, Proben mit *N*-Ethylmaleimid derivatisiert; DTT, Proben mit Dithiothreitol reduziert.

35 und 45 kDa Bande der DTT-reduzierten gegenüber den nativen Proteinen auf, vergleichbar mit dem Effekt der Monomer-Bande (jeweils einmal und doppelt PEGylierte AcPDO). Die kombinierten Ergebnisse können als erster biochemischer Hinweis für eine Disulfidbrücke zwischen C<sub>87</sub> und C<sub>224</sub> interpretiert werden, die jedoch nicht in allen AcPDO-Molekülen gleichermaßen ausgebildet ist. Es könnte sich somit um einen dynamischen Prozess der Disulfidbrücken-Bildung und -Öffnung handeln.

Mit der Bestimmung der 3D-Struktur der AcPDO wurde deutlich, dass sich die beiden Cysteine, wie in der Strukturvorhersage, an der Proteinoberfläche befinden und eine Disulfidbrücke ausbilden (Abb. 3.31 AB). Die Cysteine sind dabei in relativ großer Entfernung zum katalytischen Eisenzentrum ( $\approx 16$  Å) und der Bindungstasche abgewandt. Die Elektronendichte für eine Disulfidbrücke ist jedoch in beiden Untereinheiten der asymmetrischen Einheit deutlich sichtbar (Abb. 3.31 C). Der Bereich der fehlenden C-terminalen 22 Aminosäuren (inklusive der zehn Aminosäuren des Strep-Tags) hinter C<sub>224</sub> bzw. dem anschließenden G<sub>225</sub> war zu flexibel und konnte keiner Elektronendichte angepasst werden. Kristallisationsversuche der C<sub>87</sub>A- und der C<sub>224</sub>A-Variante unter gleichen

und leicht abweichenden Kristallisationsbedingungen, wie für den AcPDO-Wildtyp verwendet, ergaben keine Kristalle innerhalb von 14 Tagen. Es ist daher davon auszugehen, dass die Disulfidbrücke, trotz gleichbleibender Thermostabilität der Alanin-Varianten im Vergleich zum Wildtyp, stabilisierende Auswirkungen auf die AcPDO besitzt. Im humanen Enzym ist C<sub>87</sub> durch ein Serin ersetzt (S<sub>100</sub>) und das C<sub>224</sub> Homolog (C<sub>247</sub>) ist zweifach oxidiert (Abb. 3.31 D). Gleiches wurde ebenfalls für das homologe Cystein aus *Ar. thaliana* beobachtet (McCoy *et al.*, 2006b). Die Elektronendichte ist zwischen dem Serin und den Cystein im hETHE1 durchgehend vorhanden, was auf eine Interaktion der beiden Reste hindeuten könnte.

Mutationen im hETHE1 Gen resultierten alle in verringerten Enzymaktivitäten (Abb. 3.28 B). Die Substitution von C<sub>247</sub> zu Alanin bewirkte einen Abfall der Enzymaktivität auf  $\approx 18$  %, was verglichen mit der entsprechenden AcPDO Variante eine deutlich höhere Restaktivität darstellt. Jung *et al.* (2016) hatten bereits eine C<sub>247</sub>S Variante von hETHE1 hergestellt, die ähnliche Enzymaktivitäten aufwies ( $\approx 12$  % Restaktivität verglichen mit dem Wildtyp-Enzym) und hatten C<sub>247</sub> als essentiell für die PDO-Aktivität eingestuft. Die S<sub>100</sub>C-Variante, die dem Wildtyp-Zustand der



**Abbildung 3.31** | Strukturelle Darstellung von Oberflächen-Cysteinen in der AcPDO und dem hETHE1. **A**, AcPDO Untereinheit mit aktivem Zentrum und Substratbindungstasche. **B**, 90° Drehung der AcPDO-Untereinheit mit Disulfidbrücken-bildenden Oberflächen-Cysteinen. **C**, Disulfidbrücken-bildende Cystein-Reste der AcPDO mit dazugehöriger Elektronendichte. **D**, Homologe Aminosäuren im hETHE1-Enzym mit dazugehöriger Elektronendichte (PDB ID: 4CHL).

AcPDO mit experimentell gezeigter Bildung einer Disulfidbrücke entsprechen würde, resultierte ebenfalls in einer Senkung der Enzymaktivität auf  $\approx 38\%$ , wobei die S<sub>100</sub>A Variante mit  $\approx 62\%$  Restaktivität am wenigsten beeinträchtigt war. Dies deutet daraufhin, dass es im humanen Enzym zu einer anderen Kompensation der Rolle der Disulfidbrücke kommen muss. Mutationen der verbliebenen Cystein-Reste der AcPDO resultierten in Restaktivitäten von 12 % für C<sub>117</sub>A, 54 % für C<sub>137</sub>A und 89 % für C<sub>180</sub>A (Abb. 3.28 A). C<sub>117</sub> ist in der MxPDO durch Serin ersetzt und befindet sich im Zentrum von Wasserstoffbrücken und Wassermolekülen um die Histidin-Liganden des katalytischen Eisenatoms. Der Austausch von C<sub>117</sub> zu Serin führte in der AcPDO zu einer Verminderung der Enzymaktivität auf lediglich  $\approx 68\%$  (Abb. 3.28 A). Wahrscheinlich stabilisieren C<sub>117</sub>, bzw. S<sub>116</sub> (MxPDO) die Umgebung des Eisens, sind aber nicht direkt in die Katalyse involviert.

MALDI-TOF Massens-fingerprints wurden genutzt, um Modifikationen von Cystein-Seitenketten mit und ohne Vorbehandlung mit N-Ethylmaleinimid (NEM), DTT oder GSSH zu identifizieren. In den meisten Massefrag-

menten NEM-behandelter AcPDO wurde Cystein als NEM-Thiol-Addukt gefunden, unabhängig vom Oxidationszustand des Proteins. Geringe Mengen an Cystein-Dioxiden und -Trioxiden wurden identifiziert, wobei kein direkter Hinweis auf das Vorkommen von Cystein-Persulfiden bzw. -Polysulfiden gefunden wurde, wie für hETHE1 postuliert (Jung *et al.*, 2016). Im Gegensatz dazu wurden in der AcPDO Cystein-GSH-Addukte nach Inkubation mit GSSH identifiziert (Protein-S-Glutathionylierung; Tab. 3.4). C<sub>87</sub> besaß einen hohen Anteil dieser Addukte, verglichen mit der NEM-Derivatisierung ( $> 50\%$  der Anzahl von NEM-Addukten). Geringere Anzahlen waren an den Aminosäuren C<sub>224</sub> und C<sub>137</sub> vorhanden (10 bzw. 6,7 % der identifizierten Fragmente wiesen ein GSH-Addukt auf). C<sub>224</sub> war dabei in der massenspektrometrischen Analyse nur vereinzelt in unvollständig gespaltenen Oktadekapeptiden nachweisbar, da das vollständig gesplattene Peptid nur aus drei Aminosäuren bestand und deshalb unterhalb der Detektionsgrenze der Geräteeichung blieb. Die C<sub>87</sub>A und C<sub>224</sub>A Varianten zeigten die erwarteten Differenzen von 32 Masseinheiten zum Wildtyp in den entsprechenden Fragmenten, was

**Tabelle 3.4** | Relative Abundanzen von Cystein-Modifikationen aus MALDI-TOF Massen-*fingerprints* nach Behandlung der AcPDO mit verschiedenen Substraten für jeweils 1 min. Reaktionen wurden in Enzymtestpuffer (70 mM Tris/HCl, pH 7,5; 0,1 % Tween 20) inkubiert und anschließend mit NEM derivatisiert. GSH und GSSH jeweils 1 mM; S<sup>0</sup> jeweils 2 % (w/v). 100 % entsprechen jeweils der Gesamtanzahl von identifizierten Peptidfragmenten der massenspektrometrischen Analysen.

Cystein-Rest	Relative Abundanz (%)					
	C <sub>87</sub>		C <sub>137</sub>		C <sub>224</sub>	
	GSH	NEM	GSH	NEM	GSH	NEM
Inkubation/ Derivatisierung						
Wt	0	0	0	0	0	0
Wt + NEM	0	97,6	0	75,5	0	35,0
Wt + GSH + S <sup>0</sup> + NEM	2,5	96,6	0	87,7	0	33,3
Wt + GSSH + NEM	54,1	45,5	6,7	60,0	10,0	20,0
Wt + S <sup>0</sup> + NEM	60,1	39,9	18,7	47,8	0	33,3
Wt + GSH + NEM	0	98,8	0	88,1	0	25,0
C <sub>87</sub> A + GSSH + NEM	0	0	39,7	39,7	10,9	26,6
C <sub>224</sub> A + GSSH + NEM	10,0	0	18,2	81,8	0	0

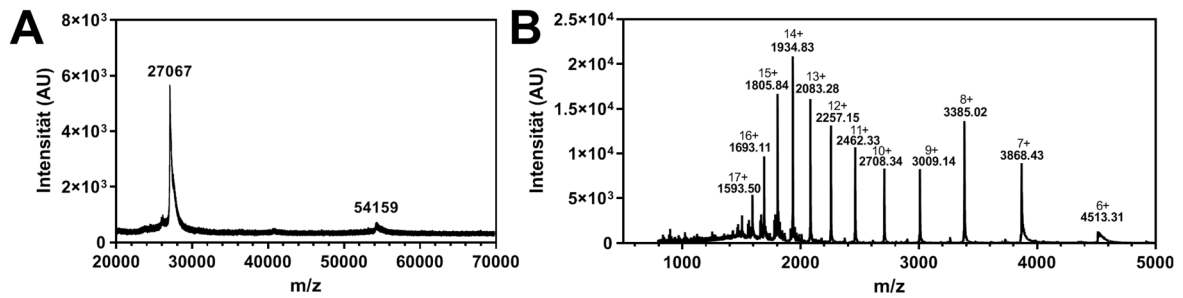
einen erfolgreichen Austausch von Cystein zu Alanin bestätigte. Das jeweils verbliebene Cystein zeigte dabei immer eine partielle Glutathionylierung nach GSSH-Behandlung (ca. 10 % der Fragmente zeigten ein GSH-Addukt). C<sub>117</sub> und C<sub>180</sub> wiesen dagegen in Gesamtsumme nicht mehr als zwei Glutathionylierungs-Signale auf und wurden in diesem Zusammenhang als „inaktiv“ interpretiert. Für C<sub>137</sub>, welches in der Struktur von außen scheinbar unzugänglich in den Innenraum des Enzyms gerichtet ist, wurden dagegen ebenfalls Glutathionylierungs-Signale erfasst.

MALDI-TOF-Massenspektrometrie der nativen AcPDO ergab zwei Hauptpeaks, mit Masseinheiten von jeweils 27 067 (AcPDO Monomer) und 54 148 (AcPDO Dimer, Abb. 3.32 A). Nicht-dekonvolutierte Elektrospray-MS der nativen AcPDO resultierte dagegen in Peaks mit leicht abweichenden Masseinheiten zwischen 27 074 und 27 106 (Abb. 3.32 B). Die kalkulierte Masse der AcPDO beträgt bei einer durchschnittlichen Isotopen-Zusammensetzung 27 077 Masseinheiten inklusive des Strep-Tags, was ungefähr der ermittelten Masse mittels der ESI- und MALDI-Analysen entspricht. Abweichende Massepeaks hatten Masseunterschiede von +16 bzw. ein Mehrfaches davon und entsprechen damit dem Wert

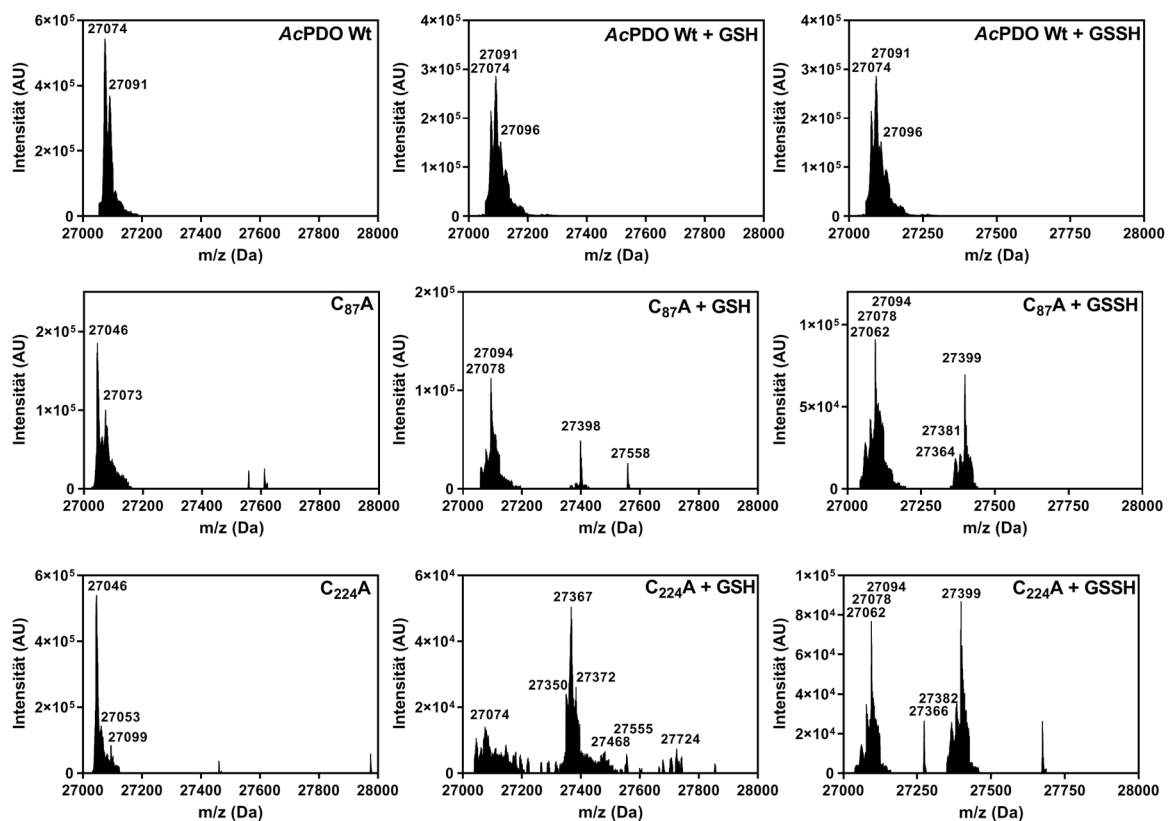
von Sauerstoffatomen, was auf Oxidation an unbestimmten Aminosäuren des Proteins in der nativen Form hindeutet. Diese sieht man auch in MALDI-Messungen der dimeren Form des Proteins (nicht gezeigt).

ESI MS des AcPDO-Wildtyp Holoenzym zeigten Hauptpeaks von 27 074 und 27 091 Masseinheiten, welche nahe an der erwarteten Masse des nicht-modifizierten Enzyms liegen und auf ein einfaches Oxidationsereignis (+16 Masseinheiten) schließen lassen (Abb. 3.33). Nach Inkubation mit GSSH trat eine breite Spanne an kleineren Peaks mit Massen zwischen 27 390 – 27 420 im AcPDO-Wildtyp auf. Der Masseunterschied verglichen zum nativen Enzym ist mit + 352 Masseinheiten leicht höher als die Masse von GSH (+305 Masseinheiten), was auf teilweise Oxidation des Enzyms und/oder die Anwesenheit von Na<sup>+</sup>-Ionen hindeutet. Ein abweichendes Muster wurde in den C<sub>87</sub>A und C<sub>224</sub>A Varianten beobachtet, wobei sich der Hauptpeak mit 27 046 Masseinheiten im nicht-modifizierten Enzym zu 27 078 bzw. 27 094 Masseinheiten verschob, sowohl nach Inkubation mit GSH als auch nach Inkubation mit GSSH. Grundsätzlich hierfür könnten sowohl doppelte bzw. dreifache Oxidationen, oder auch Persulfurierungen an der AcPDO sein. Zusätzlich sind die





**Abbildung 3.32** | Massenspektren des AcPDO-Holoenzym. **A**, MALDI-TOF Spektrum. **B**, Nicht-dekonvolutiertes ESI-Spektrum im positiven Ionisierungszustand.

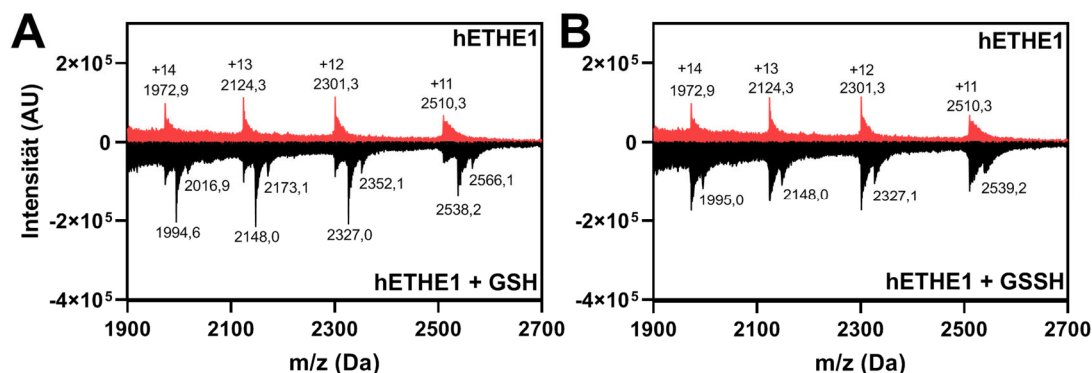


**Abbildung 3.33** | Dekonvolutierte ESI Massenspektren von AcPDO-Holoenzymen. Dargestellt sind sowohl die nativen Formen des AcPDO-Wildtyps und der Varianten C<sub>87</sub>A und C<sub>224</sub>A, als auch nach Inkubation mit GSH bzw. GSSH.

Massepeaks bei 27 398 bzw. 27 399 durch die Masseverschiebung von 305, ausgehend vom Hauptpeak mit 27 094 Masseinheiten, ein deutlicher Hinweis auf Protein-S-Glutathionierung, wie sie bereits in den MALDI-TOF Massen-fingerprints nachgewiesen wurde. Lediglich C<sub>224</sub>A zeigt nach Inkubation mit GSH ein komplexeres Muster mit einem Hauptpeak, der einem einfach oxidierten GSH-Addukt entspricht. Kontrollmessungen mit Tris(2-carboxyethyl)phosphin (TCEP)-behand-

deltem Wildtyp-Enzym ergaben ein undefiniertes Fragmentierungsmuster der AcPDO (nicht gezeigt).

Für das hETHE1 war bereits biochemisch eine Modifikation von C<sub>247</sub> (hETHE1 Nummerierung) gezeigt und als Polysulfidierung interpretiert worden (Jung *et al.*, 2016). Um dies zu überprüfen, wurden die ESI-Analysen der AcPDO mit dem humanen Enzym wiederholt (Abb. 3.34). In den nicht dekonvolutierten Massenspektren sieht man nach GSH- und



**Abbildung 3.34** | ESI Massenspektren des hETHE1-Wildtyps. **A**, Massenspektrum des nativen hETHE1-Wildtyps (rot) im Vergleich zum GSH-inkubierten Enzym (schwarz) in einem Masse- zu Ladungsbereich von + 11 bis + 14. **B**, Massenspektrum des nativen hETHE1-Wildtyps (rot) im Vergleich zum GSSH-inkubierten Enzym (schwarz) in einem Masse- zu Ladungsbereich von + 11 bis + 14

GSSH-Inkubation eine Verschiebung des Hauptpeaks, die einer Masse von + 305 entspricht und damit ebenfalls auf eine Protein-S-Glutathionylierung zurückzuführen ist. Nach GSH-Inkubation tritt zusätzlich ein zweiter Massepeak mit einer Masse von + 610 auf, was auf zwei Glutathionylierungs-Ereignisse schließen lässt. ESI-Analysen der Variante S<sub>100</sub>C resultierten ebenfalls in einem Auftreten eines Massepeaks von + 305 nach Inkubation mit GSH bzw. GSSH, während die Alanin-Varianten der Aminosäuren S<sub>100</sub> und C<sub>247</sub> keine Glutathionylierung aufwiesen (nicht gezeigt).

Zusammenfassend zeigten sowohl MALDI *fingerprints* als auch die MS-Analysen des Holoenzym, sowohl von Wildtyp als auch von Cystein-Varianten, Belege für eine kovalente Glutathionylierung von AcPDO und hETHE1 nach Inkubation mit seinem Substrat bzw. dem Reaktionsprodukt, ausgehend von einer Disulfidbrücke in der AcPDO und möglicherweise von einer Cys-Sulfensäure oder einem Cys-Thiyl-Radikal im hETHE1.

### 3.8 Inhibitionsstudien der AcPDO

Inhibitionsstudien der AcPDO wurden bereits zuvor durchgeführt, wobei berichtet worden war, dass die PDO-Aktivität in Anwesenheit von 1 mM NEM mit einer Restaktivität von 0,16 % fast komplett inhibiert sei (Wang

*et al.*, 2014). NEM ist ein von der Maleinsäure abgeleitetes Imid, welches Sulfhydryl-Gruppen kovalent bindet und somit frei zugängliche Cystein-Reste blockiert. In der vorausgegangenen Inhibitionsstudie wurde jedoch nicht die Frage beantwortet, ob NEM die Thiolgruppen der PDO, die des Substrates GSSH bzw. von GSH oder beides inaktiviert.

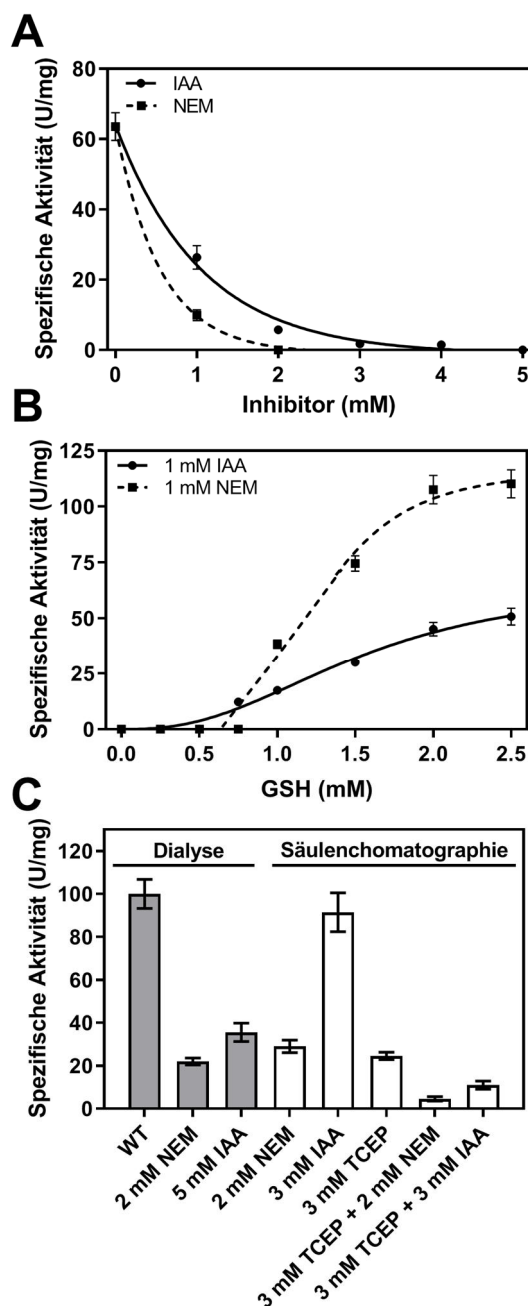
Wang *et al.* (2014) haben NEM direkt in den Enzymtestansatz zum Enzym-Substrat-Gemisch gegeben. Ein vergleichbares Vorgehen, mit 1 mM GSH und einem Überschuss an elementarem Schwefel, resultierte in einer Restaktivität der AcPDO von 16 % in Anwesenheit von 1 mM NEM. In Anwesenheit von 2 mM NEM wurde keine Enzymaktivität mehr beobachtet. Enzymaktivitätsmessungen mit IAA unter ansonsten gleichen Bedingungen resultierten in 42 bzw. 9 % Restaktivität in Anwesenheit von jeweils 1 und 2 mM IAA, welches ein Alkylierungsmittel für Sulfhydryl-Gruppen darstellt. Eine gesamte Inhibition des Enzyms wurde erst bei Konzentrationen von 5 mM IAA erreicht (Abb. 3.35 A).

Wenn die Inhibitorkonzentration konstant bei 1 mM gehalten und das Co-Substrat GSH dem Ansatz hinzutitriert wurde, war keine PDO-Aktivität bei GSH-Konzentrationen unterhalb von 0,75 – 1 mM messbar. Steigende GSH-Konzentrationen führten zu einer Rückgewinnung der Enzymaktivität auf Wildtyp-Niveau, was darauf schließen lässt, dass die

Inhibitoren nicht nur an das Enzym, sondern an alle verfügbaren Thiole binden (Abb. 3.35 B). Die Vorinkubation mit NEM und anschließender Entfernung des überschüssigen Inhibitors durch Dialyse oder erneuter Strep-Tag-Säulenaффinitätschromatographie resultierte in einer Restaktivität von 22 – 29 %, verglichen mit der Inhibitor-freien aber gleich behandelten Kontrolle (Abb. 3.35 C). Die gleiche Behandlung des Enzyms mit 5 mM IAA zeigte 36 % Aktivität, wenn überschüssiges IAA mittels Dialyse entfernt wurde, und 91 % mit 3 mM IAA nach Säulenaффinitätschromatographie (Abb. 3.35 C). Die Ergebnisse zeigen, dass die Inhibition der AcPDO durch NEM und IAA, zumindest teilweise, aufgrund von GSH- bzw. GSSH-Modifikationen resultiert und dass sie nicht dauerhaft ist.

Um zu bestimmen, ob der Redoxzustand der AcPDO wichtig für die Katalyse ist, wurde das Enzym in einer Anaerobenkammer mit Tris(2-carboxyethyl)phosphin (TCEP) reduziert. TCEP dient dabei der selektiven, irreversiblen Reduktion von Disulfidbrücken, bzw. der Verhinderung von Cystein-Oxidationen. TCEP wurde nach Inkubation mit dem Enzym mittels Säulenchromatographie unter anaeroben Bedingungen entfernt. Die verbleibende Enzymaktivität betrug  $\approx 25$  %, verglichen mit dem nicht-reduzierten Protein, welches unter aeroben Bedingungen sofort nach der anaeroben Säulenchromatografie getestet wurde. Wenn das TCEP-reduzierte Enzym zusätzlich mit 2 mM NEM oder 3 mM IAA auf der Chromatographie-Säule inkubiert wurde, betrugen die Enzymaktivitäten zwischen 5 und 10 %, verglichen mit dem unbehandelten und nicht-reduzierten Protein (Abb. 3.35 C).

Zusammengefasst deutet die deutliche Verringerung der Enzymaktivität nach TCEP-Behandlung, die nach anschließender NEM- bzw. IAA-Inkubation nochmals verstärkt wurde, daraufhin, dass die Reduktion der Cysteine das gesamte Protein empfindlicher für die Inhibitoren machen könnte und das Aufbrechen der Disulfidbrücke somit die Enzymreaktion beeinträchtigt.



**Abbildung 3.35** | Auswirkungen von Inhibitoren auf die AcPDO. **A**, Bestimmung der AcPDO-Restaktivität in Anwesenheit von 1 mM GSH, 2 % [w/v] Schwefel und *N*-Ethylmaleinimid (NEM) oder Iodacetamid (IAA), nach Zugabe des Inhibitors direkt in das Enzymtestgemisch. **B**, Wie in A, jedoch mit konstanten Inhibitorkonzentrationen und Titration verschiedener GSH-Konzentrationen. **C**, Bestimmung der AcPDO-Restaktivität nach Vorinkubation mit NEM, IAA oder Tris(2-carboxyethyl)-phosphin (TCEP) mit anschließender Dialyse oder Säulenchromatographie vor dem Enzymtest. Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung von Triplikat-Messungen.



## Diskussion

PDOs besitzen eine zentrale Rolle bei der zellulären Detoxifikation von Schwefelwasserstoff, sowohl in Eukaryoten als auch in Prokaryoten (Hildebrandt & Grieshaber, 2008, Nguyen *et al.*, 2013). Insbesondere seit der Entdeckung, dass die autosomal rezessive und infantil-letale Stoffwechselerkrankung Ethylmalonsäure Enzephalopathie (EE) eine Folge von Mutationen in der humanen PDO ist, wurde die Forschung an Proteinen der PDO-Familie intensiviert. In der vorliegenden Arbeit erfolgte eine grundlegende molekulare und strukturelle Charakterisierung der PDO aus dem acidithermophilen Bakterium *At. caldus* CSH-12 ( $T_{\text{Opt}}$ : 45 °C;  $\text{pH}_{\text{Opt}}$ : 2-2,5; Hallberg & Lindström (1994)).

Studien am eng verwandten *At. caldus* Stamm MTH-04 zeigten, dass der Organismus drei PDO-ähnliche Gene besitzt (Wu *et al.*, 2017). Zwei der drei heterolog in *E. coli* produzierten Proteine zeigten PDO-Aktivität. Die Gene sind in den ORFs A5904\_0421 und A5904\_0790 codiert und wurden von den Autoren also SDO1 und SDO2 benannt (Klassifizierung als Schwefel Dioxygenase, SDO). SDO2 besitzt eine Sequenzidentität von 99 % zu der hier charakterisierten PDO aus *At. caldus* CSH-12. Eine Deletion oder Überexpression beider *pdo* Gene in *At. caldus* MTH-04 hatte keinen signifikanten Einfluss auf dessen Wachstum mit Schwefel als Energiequelle (Wu *et al.*, 2017), was darauf hindeuten könnte, dass Schwefel-oxidierende Enzyme wie die SOR in *At. caldus* wichtiger für die Schwefeloxidation sind (Janosch *et al.*, 2009, Janosch *et al.*, 2015), wobei dem Organismus nach zusätzlicher Deletion des *sor* Gens, vermutlich durch Transposition des Transposons, weiterhin Schwefeloxidation möglich war (You *et al.*, 2011, Wu *et al.*, 2017). Eine Deletion des SDO2-Homologen *pdo* Gens in dem verwandten Bakterium *At. ferrooxidans* bestätigte ebenfalls, dass die PDO nicht das einzige Enzym für das chemolithoautotrophe Wach-

tum mit Schwefel in solchen Bakterien darstellt (Wang *et al.*, 2014).

Biochemische Charakterisierungen hatten gezeigt, dass beide PDOs aus *At. caldus* MTH-04 GSSH als Substrat nutzen können mit vergleichbaren  $K_M$ -Werten.  $K_{\text{cat}}$  hingegen war für die SDO2 gegenüber SDO1 ca. neunfach erhöht (Wu *et al.*, 2017). Die maximale spezifische Enzymaktivität betrug für die SDO2 2 336 mU/mg Protein mit Schwefel und GSH im Enzymtest bei pH 8, SDO1 hatte dagegen eine spezifische Enzymaktivität von 66 mU/mg Protein mit GSSH als Substrat. Im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit wurde für die PDO aus *At. caldus* CSH-12 eine um ca. 25x höhere Enzymaktivität mit Schwefel und GSH im Vergleich zur SDO2 beobachtet (s. Kap. 3.1; Abb. 3.6). Die Unterschiede waren noch eklatanter, wenn GSSH direkt als Substrat genutzt wurde. Hauptausschlaggebend hierfür dürfte der in dieser Arbeit entwickelte modifizierte Enzymtest sein, bei dem der Reaktionspuffer zuvor auf Reaktionstemperatur (40-45 °C) vorgeheizt, kürzere Inkubationszeiten verwendet (Gesamtreaktion: 50 s) und die Enzymreaktion durch Zugabe des Enzyms gestartet wurde. Die kurzen Reaktionszeiten könnten ebenfalls eine Erklärung dafür sein, dass die Maximaltemperaturen des Temperaturprofils deutlich über dem Schmelzpunkt des Enzyms liegen (s. Abb. 3.4 und 3.7). Ein ähnlicher Effekt wurde für die SOR aus *Tv. paradocus* beobachtet, welche einen Schmelzpunkt von 80 °C besitzt, jedoch Enzymaktivitäten bis 98 °C aufweist (s. Kapitel 4 für Details).

### Die AcPDO ist ein Homotetramer in Lösung

Die meisten PDOs zeigen sich in ihren Röntgenkristallstrukturen und in Molekularanalysen als Dimer. Gelfiltration, native Gelelektrophorese und massenspektrometrische Analysen des hETHE1 Proteins waren zunächst nicht eindeutig, deuteten jedoch auf

ein überwiegendes Vorkommen als Dimer hin, wobei in chromatographischen Analysen auch immer wieder Monomere beobachtet wurden mit Dimer zu Monomer Verhältnissen von  $\approx 10:1$  (Tiranti *et al.*, 2006, Kabil & Banerjee, 2012, Henriques *et al.*, 2014, Pettinati *et al.*, 2015). Ein ausschließliches Vorkommen als Monomer wurde für das Rhodanase-PDO-Fusionsprotein aus *Paraburkholderia phytofirmans* beschrieben (Motl *et al.*, 2017). Die hETHE1-Kristallpackung deutete dagegen auf eine dimere Form in der asymmetrischen Einheit hin, wie sie für die meisten anderen PDOs beobachtet wurde, zu denen strukturelle Daten vorliegen (Pettinati *et al.*, 2015). Eine Ausnahme bildet die PDO aus *Arabidopsis thaliana*, die in der kristallographisch asymmetrischen Einheit (AU) ein Tetramer bildet, wobei die Autoren die biologisch aktive Einheit als Dimer interpretierten (McCoy *et al.*, 2006b). Das TypIII-PDO-Rhodanase Fusionsprotein aus *S. aureus* wurde dagegen sowohl kristallographisch als auch anhand von Gelfiltrationsanalysen als Tetramer beschrieben (Shen *et al.*, 2015), wobei Mutationen oberflächenassoziierter Aminosäuren dagegen zu höheren Oligomerisierungszuständen in der *S. aureus*-PDO führten.

Eine homotetramere Organisation wurde in dieser Arbeit ebenfalls für die AcPDO beobachtet (s. Kap. 3.3). Zwar zeigt die Kristallpackung ein Dimer in der asymmetrischen Einheit, jedoch wird die Interaktion lediglich durch symmetrisch angeordnete Paare von zwei Aminosäuren ( $M_1$  und  $T_{22}$ ) vermittelt und scheint demnach überwiegend kristallographischer Natur zu sein (s. Abb. 3.13). Gelfiltrationsanalysen zeigten konsistent ein Auftreten als Tetramer, welches gegen Denaturierung mit Harnstoff beständig war, jedoch nicht gegen Guanidinium Hydrochlorid (s. Abb. 3.14). Dagegen eluierte das hETHE1 später, was das Vorkommen als Dimer bestätigt. Interessanterweise lagern sich den kristallographischen Elementarzellen der AcPDO-Kristalle zwei Dimere dicht zusammen. Die Schnittstelle wird dabei von positiven/negati-

ven Aminosäuren gebildet ( $R_{186}-W_{177}$ ,  $R_{125}-L_{166}$ ,  $R_{106}-G_{101}$ ,  $R_{106}-W_{23}$ ,  $K_4-E_{164}$ ,  $M_1-D_{103}$ ) unterstützt von hydrophoben Paarungen, die somit eine stärkere Interaktion bilden, als es im Dimer der AU der Fall ist und das Vorkommen als Tetramer wahrscheinlicher machen (s. Abb. 3.15).

Das Homotetramer erklärt auch den sigmoidalen Kurvenverlauf der Enzymkinetik mit GSSH mit einem Hill-Koeffizienten  $n_H$  von 2,3, der auf das Vorhandensein von mehr als zwei Untereinheiten während der Katalyse mit positiver Kooperativität hindeutet (s. Kap. 3.1; Abb. 3.6). Da GS(S)H in der AcPDO jedoch nicht nur an das Eisenzentrum binden kann könnte der sigmoidale Kurvenverlauf auch ein Resultat der Substratinteraktion mit Cysteinresten, insbesondere mit den Oberflächen-assoziierten  $C_{87}$  und  $C_{224}$  sein. Eine vergleichbare sigmoidale Abhängigkeit von GSSH-Konzentrationen war ebenfalls bei Messungen der  $O_2$ -Verbrauchsrate in der PDO des Ringelwurms *Urechis unicinctus* beobachtet worden, wobei das Enzym nicht im Hinblick auf Kooperativität der Untereinheiten analysiert wurde (Zhang *et al.*, 2013b). Auch hETHE1-Enzymvarianten hatten in neueren Untersuchungen sigmoidale Abhängigkeiten gezeigt, diese waren jedoch unkommentiert geblieben (Kabil *et al.*, 2018). Da der hETHE1-Wildtyp eine typische Michaelis-Menten Kinetik zeigte (Kabil & Banerjee, 2012) ist es denkbar, dass einzelne Aminosäureaustausche Auswirkungen auf die Oligomerisierung von PDOs haben könnten oder dass es sich in Lösung um einen hydrodynamischen Prozess der Multimerisierung handelt. Hierfür sprechen auch native Gelelektrophoresen der AcPDO, in denen neben dimeren und tetrameren ebenfalls octamere und decamere Multimerisationszustände des nativen Enzyms beobachtet wurden.

Im Gegensatz zu der Enzymkinetik mit GSSH als Substrat wies die AcPDO mit GSH und Schwefel im Enzymtest eine klassische Michaelis-Menten-Kinetik auf. Der Unterschied kann durch die unbekannte Kinetik der

nicht-enzymatischen Reaktion von  $S^0$  im reaktiven GSH-Sulfanschwefel-Reaktionsgemisch erklärt werden (Toohey, 2011). Diese Reaktion führte auch zu den ursprünglichen Namen der Enzymklasse, den Schwefel Dioxygenasen (Rohwerder & Sand, 2003).

### Zentrale Aminosäurereste des H-Brücken-Netzwerks sind essentiell für die Aktivität

GSH/GSSH-bindende Aminosäurereste stehen im Fokus der medizinischen ETHE1-Forschung, da insbesondere  $R_{163}$  (hETHE1 Nummerierung;  $R_{139}$  in der AcPDO) eine wichtige Rolle für das humane Enzym zu haben scheint. Variationen an dieser Position im Enzym führen überproportional häufig zur EE-Erkrankung (Tiranti *et al.*, 2004, Tiranti *et al.*, 2006, Zafeiriou *et al.*, 2007). Es wird außerdem angenommen, dass der Sauerstoff des  $R_{163}$ -backbones ein Teil der sekundären Koordinationssphäre ist. Spektroskopische Analysen des Eisenzentrums in hETHE1  $R_{163}W/Q$ -Varianten zeigten, dass diese ein negativeres Fe-Reduktionspotentials zur Folge hatten und die Varianten gleichzeitig nur noch  $\approx 10\%$  der katalytischen Aktivität besaßen (Henriques *et al.*, 2014). Für die AcPDO wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit eine umfassende Mutagenese-Studie der Aminosäuren des Wasserstoffbrückennetzwerkes rund um das aktive Zentrum durchgeführt, um die Funktion der einzelnen Reste zu charakterisieren (s. Kap. 3.5 und Tab. 3.5 für eine Übersicht aller untersuchten Enzymvarianten).

In der AcPDO hatte die Alanin-Variante des  $R_{163}$ -homologen, konservierten  $R_{139}$  ebenfalls eine sehr geringe Enzymaktivität, allerdings ohne gänzlichen Aktivitätsverlust (s. Abb. 3.22).  $D_{141}$  bildet ein Ionenpaar mit  $R_{139}$ , weshalb es nicht verwunderlich ist, dass die Aktivität der  $D_{141}A$  Variante in einem vergleichbaren Ausmaß abnahm. Beide Varianten, aber insbesondere  $D_{141}A$ , zeigten in nanoDSF-Messungen reduzierte Schmelzpunkte, verglichen mit dem Wildtyp-Enzym (s. Abb. 3.24).

$R_{190}$  und  $K_{212}$  der AcPDO sind in der Röntgenkristallstruktur der TypII-PDO aus

*Pseudomonas putida* durch die nicht homologen Aminosäuren  $R_{250}$  und  $R_{253}$  ersetzt (Sattler *et al.*, 2015), jedoch zusammen mit  $P_{211}$  in allen TypI-Enzymen konserviert. Die verbleibenden Aktivitäten betrugen  $\approx 10\%$  für  $Y_{173}A$  und  $K_{212}A$  im Vergleich zum Wildtyp, während  $P_{211}A$  ca. 38 % Restaktivität aufwies, was darauf hindeutet, dass andere Aminosäurereste die funktionalen Verluste zumindest teilweise kompensieren können.  $R_{190}A$  hingegen hatte deutlich stärkere Auswirkungen auf die Enzymaktivität (2,7 % Restaktivität), was auf eine wichtige Rolle des Restes für die Substratbindung/-orientierung hindeutet, ähnlich wie  $R_{139}$  (0,46 %; s. Abb. 3.26).

Die Region zwischen  $T_{56}$  und  $H_{62}$  bildet ein kurzes Aminosäuremotiv (Konsensus T-H-hydrophob-H-A-D-H-hydrophob-T/S), welches in allen Typ I- und Typ II-PDOs konserviert ist. In Typ III-Enzymen ist das dritte Histidin dagegen durch ein Phenylalanin oder Tyrosin ersetzt.  $T_{56}$  ist ein Aminosäurerest der sekundären Koordinationssphäre,  $H_{57}$  ein Eisenligand, während  $D_{61}$  und  $H_{62}$  ein Ionenpaar bilden, welches mit  $H_{171}$  verbunden ist. Strukturell befinden sich  $D_{61}$  und  $H_{62}$  in einem loop der einen Teil der Substratbindungstasche bildet und sich in unmittelbarer Nähe zum katalytischen Eisenatom befindet.  $H_{59}$  ist das Homolog zu hETHE1- $H_{81}$  und befindet sich ebenfalls in diesem loop. Es scheint dabei über ein Wassermolekül  $D_{61}$  zu koordinieren und mit seinem N $\epsilon$ -Atom eine Wasserstoffbrücke zu  $E_{55}$  auszubilden. In einer vorangegangenen Studie wurde hETHE1- $H_{81}$  als Aminosäure identifiziert, die möglicherweise wichtig für die GSSH-Persulfid-Bindung als ersten Reaktionsschritt, noch vor der Eisenbindung, ist (Lin *et al.*, 2016). Über den backbone-Sauerstoff des homologen AcPDO- $H_{59}$  und von  $H_{62}$  wird der active site loop von N $\delta$  aus dem in Typ I- und Typ II-PDOs konservierten N $_{221}$  stabilisiert. In der vorliegenden Arbeit durchgeführte Mutationsanalysen zeigten, dass alle erwähnten Aminosäuren wichtig für ein funktionales Enzym sind, mit Ausnahme von  $H_{59}A$  welches noch 6,6 % Restaktivität besaß (s.

**Tabelle 3.5** | Überblick von spezifischen Aktivitäten des AcPDO- und des hETHE1-Wt und deren Varianten, Eisengehalte, Anzahl der Proteinpräparationen mit Anzahl der Aktivitätstests und Schmelzpunkte.

	Spez. Aktivität	Fe-Gehalt	Protein	# Präp.   # Assays	Tm	# Präp.   # Assays
	U/mg	mol/Unter- einheit	mg/l Medium		°C	
<b>AcPDO</b>						
Wt	61,0 ± 5,8	0,78 ± 0,10	21,1	23   59	63.0 ± 1.3	5   15
T <sub>13</sub> A	31,5 ± 3,9	0,80 ± 0,04	38,9	1   3	n.b. <sup>2</sup>	-
E <sub>55</sub> A	0,5 ± 0,04	0,71 ± 0,07	23,1	1   6	n.b.	-
E <sub>55</sub> D	53,1 ± 3,1	0,78 ± 0,07	22,0	1   3	n.b.	-
T <sub>56</sub> A	-	-	- <sup>1</sup>	3   0	-	-
H <sub>57</sub> A <sup>3</sup>	0,22 ± 0,1	0,01 ± 0,01	17,6	2   6	n.b.	-
H <sub>57</sub> G <sup>4</sup>	≤ 0,05	0,00 ± 0,00	26,6	2   6	n.b.	-
H <sub>59</sub> A	4,1 ± 0,1	0,45 ± 0,02	25,1	1   3	n.b.	-
D <sub>61</sub> A	≤ 0,05	0,53 ± 0,01	36,4	1   6	61.0 ± 0.05	1   3
H <sub>62</sub> A	≤ 0,05	0,76 ± 0,05	38,2	1   6	63.3 ± 0.05	1   3
C <sub>87</sub> A	1,2 ± 0,1	0,73 ± 0,05	39,2	2   6	63.3 ± 1.4	3   8
T <sub>110</sub> A	34,9 ± 2,1	0,75 ± 0,03	25,5	1   3	n.b.	-
H <sub>113</sub> A <sup>3</sup>	0,1 ± 0,02	0,03 ± 0,05	20,5	2   6	n.b.	-
H <sub>113</sub> G <sup>4</sup>	≤ 0,05	0,00 ± 0,00	8,4	2   6	n.b.	-
T <sub>114</sub> A	0,6 ± 0,1	0,59 ± 0,02	8,9	1   3	n.b.	-
C <sub>117</sub> A	6,3 ± 0,3	0,65 ± 0,06	15,6	3   9	n.b.	-
C <sub>117</sub> S	41,8 ± 3,2	0,86 ± 0,07	34,2	1   3	n.b.	-
T <sub>128</sub> A	18,5 ± 1,9	0,39 ± 0,05	10,8	1   3	n.b.	-
D <sub>130</sub> A <sup>3</sup>	0,06 ± 0,03	0,02 ± 0,04	41,8	2   6	n.b.	-
D <sub>130</sub> E <sup>3</sup>	0,05 ± 0,01	0,34 ± 0,33	18,6	2   6	n.b.	-
D <sub>130</sub> H <sup>3</sup>	0,7 ± 0,02	0,03 ± 0,05	30,2	2   6	n.b.	-
C <sub>137</sub> A	33,5 ± 2,0	0,81 ± 0,05	31,2	2   6	n.b.	-
R <sub>139</sub> A	0,3 ± 0,04	0,78 ± 0,02	33,5	4   9	60.7 ± 0.8	1   3
D <sub>141</sub> A	1,5 ± 0,2	0,50 ± 0,01	34,9	1   3	55.7 ± 0.2	1   3
D <sub>141</sub> E	2,32 ± 0,2	0,62 ± 0,03	42,9	1   3	n.b.	-
H <sub>171</sub> A	≤ 0,05	0,74 ± 0,20	26,2	3   9	54.9 ± 0.7	1   3
Y <sub>173</sub> A	6,6 ± 0,7	0,68 ± 0,02	26,2	3   6	n.b.	-
C <sub>180</sub> A	54,6 ± 4,7	0,79 ± 0,01	28,5	1   3	n.b.	-
R <sub>190</sub> A	1,7 ± 0,1	0,66 ± 0,02	20,1	1   3	n.b.	-
P <sub>211</sub> A	23,6 ± 0,6	0,84 ± 0,04	34,4	3   6	n.b.	-
K <sub>212</sub> A	5,8 ± 0,4	0,88 ± 0,04	38,5	3   6	n.b.	-
H <sub>213</sub> A	12,6 ± 1,2	0,78 ± 0,07	15,9	1   3	n.b.	-
N <sub>221</sub> A	0,5 ± 0,03	0,75 ± 0,04	33,3	1   6	n.b.	-
C <sub>224</sub> A	0,7 ± 0,06	0,97 ± 0,05	32,1	2   6	63.3 ± 0.05	2   6
<b>hETHE1</b>						
Wt	51,2 ± 4,7	0,92 ± 0,10	36,0	3   9	n.b.	-
S <sub>100</sub> A	32,1 ± 3,7	0,81 ± 0,10	55,0	1   3	n.b.	-
S <sub>100</sub> C	19,7 ± 1,9	0,85 ± 0,07	40,2	1   3	n.b.	-
C <sub>247</sub> A	9,1 ± 0,8	0,84 ± 0,09	34,0	1   3	n.b.	-

<sup>1</sup> es wurde kein Protein erhalten.<sup>2</sup> n.b.; nicht bestimmt.<sup>3</sup> Proteinvarianten erstellt und getestet von Seipel (2015).<sup>4</sup> Proteinvarianten erstellt und getestet von Becker (2016).

Abb. 3.22). Zusammen mit R<sub>139</sub>/D<sub>141</sub> bildet H<sub>171</sub> das Zentrum des breit gefächerten Wasserstoffbrückennetzwerks der AcPDO, welches noch weit über die unmittelbare Nähe des Eisenzentrums und der Substratbindung hinausgeht. Dieser Zusammenhang erklärt möglicherweise auch, dass die H<sub>171</sub>A-Variante einen reduzierten Schmelzpunkt aufwies (8,1 °C geringer als das Wildtyp-Enzym; s. Abb. 3.24).

### Fe-O<sub>2</sub>- und Fe-O<sub>2</sub>-SR-Intermediate am Eisenzentrum

Die AcPDO besitzt ein mononukleäres nicht-Häm Eisenatom (s. Kap. 3.4). Dieses wird auf einer Seite der oktaedrischen Koordinationssphäre von zwei Histidinen und einem Aspartat zur Eisenverankerung im Enzym und auf der anderen Seite von drei Wassermolekülen koordiniert (s. Abb. 3.16). Diese Geometrie ist typisch für das Metallbindungsmotiv der 2-His-1-Carboxylat Triade, welches Bestandteil von hunderten Eisen-Oxygenasen ist (Hegg & Que, 1997, Koehn et al., 2005, Kal & Que, 2017). Die drei Wassermoleküle koordinieren das Eisenatom dabei in vielen Fällen nur im Grundzustand und schützen es womöglich vor einer Autooxidation (Buongiorno & Straganz, 2013). Für die Katalyse werden diese Bindungsstellen, bzw. Teile davon, durch exogene Liganden ersetzt, zumeist das Substrat und O<sub>2</sub>.

Unter den Mitgliedern der Metallo-β-Lactamase-Familie befinden sich ebenfalls die Sequenz- und Struktur-verwandten Glyoxalasen II (GLXII). Diese Enzyme besitzen viele konservierte Bereiche, die auch in den PDOs vorhanden sind, unter anderem den Bereich um das Eisenbindungszentrum, wobei zwei Zink-Ionen das katalytische Zentrum der Glyoxalasen bilden (Crowder *et al.*, 1997). Das erste Zink-Atom wird in GLXII von drei Histidinen, einem Aspartat und einem Wassermolekül koordiniert und ist homolog zu dem katalytischen Eisen in PDOs. Das zweite Zink-Atom wird über die gleichen Aspartat und Wassermoleküle ligiert und befindet sich mit ≈ 3,3 Å

Abstand in unmittelbarer Nähe zum ersten Zink-Atom. Die Koordinationssphäre von Letzterem wird von den in der AcPDO homologen Aminosäuren D<sub>61</sub>, H<sub>62</sub> und H<sub>171</sub> (AcPDO Nummerierung) gebildet, welche in dieser Arbeit bereits als essentiell für die PDO-Enzymaktivität ermittelt wurden und zentrale Bausteine des Wasserstoffbrückennetzwerkes sind. Die Ähnlichkeit der Reste, die in GLXII das zweite Zinkatom binden, mit den konservierten Bereichen der PDOs des aktiven Zentrums sind vermutlich auch ein Grund, weshalb PDOs zunächst als GLXII klassifiziert worden waren, wobei später gezeigt wurde, dass sie trotz der großen Ähnlichkeit keine entsprechende Enzymaktivität aufwiesen (Maiti *et al.*, 1997, Tiranti *et al.*, 2004). GLXII-Enzyme sind jedoch nicht auf eine binukleäre Zinkbindung begrenzt, sodass verschiedene GLXII unterschiedliche Spezifitäten für Eisen, Zink und Mangan besitzen (Crowder *et al.*, 1997, Cameron *et al.*, 1999, Wenzel *et al.*, 2004, Marasinghe *et al.*, 2005). Interessanterweise waren verschiedene bivalente Metallionen, die in aktiven Zentren von GLXII vorkommen, als Inhibitoren für die AcPDO identifiziert worden (Wang *et al.*, 2014). So ergab die Inkubation mit Nickel, Zink, Kupfer, Cobalt und Quecksilber einen kompletten Aktivitätsverlust der AcPDO, was darauf hindeuten könnte, dass die Bindung der Metalle an das zweite GLXII-Metallbindungsmotiv in PDOs womöglich nicht artifiziell ist und/oder das Eisen des katalytischen Zentrums ersetzt wird was in einem Funktionsverlust der PDO-Reaktion resultiert. Denkbar ist, dass solche PDOs mit zwei gebundenen Metallionen eine andere katalytische Aktivität haben könnten, jedoch ist dies bis heute nicht untersucht. Es ist jedoch auch nicht auszuschließen, dass Metalle irreversibel an den GSSH-Persulfidanteil binden und somit die enzymatische Reaktion unterbinden.

EPR-Spektren zeigten, dass das Eisen der AcPDO nach Isolation im Oxidationszustand +3 vorliegt (s. Abb. 3.17). Nach Inkubation mit GSSH kommt es zu einer leichten Re-

duktion des Zentrums. Außerdem ist eine Formveränderung des negativen isotropen  $g = 4,3$  Signals im EPR-Spektrum sichtbar, was auf eine sich ändernde Eisengeometrie oder transiente Radikale während der Katalyse schließen lässt, jedoch spekulativ ist. Das Reduktionspotential des Eisenzentrums ist für mononukleäre nicht-Häm Eisenzentren mit  $E_0' = -233,8$  mV relativ gering (Costas *et al.*, 2004), jedoch vergleichbar mit denen des hETHE1 (-272 mV; Henriques *et al.*, 2014). Ein ähnlich niedriges Reduktionspotential wurde für die Schwefel Oxygenasen Reduktasen aus *Ac. ambivalens* und *Tv. paradoxus* beobachtet, die ebenfalls ein mononukleäres nicht-Häm Eisenatom besitzen und für die  $E_0'$  von -268 mV bzw. -252 mV ermittelt wurden (Urich, 2005; Diese Arbeit, Kap. 5). Es war vermutet worden, dass das niedrige Reduktionspotential die Folge einer Anhäufung saurer Aminosäurereste in direkter Umgebung des Eisenzentrums sei, dies konnte jedoch zumindest für die AaSOR nicht bestätigt werden (Urich, 2005). Auch für die AcPDO ist dies nicht der Fall, bei der sogar eine signifikant höhere Anzahl basischer im Vergleich zu sauren Aminosäureresten in einem Umkreis von bis zu 8 Å um das Eisenzentrum vorhanden sind, sodass die Ursache des niedrigen Reduktionspotentials ungeklärt bleibt. *Stopped Flow*-Spektren zeigten spezifische Ladungstransfer-Spezies (315, 420, 523 und 610 nm) nach Inkubation der AcPDO mit GSSH (s. Abb. 3.20). Für hETHE1 wurden kürzlich spektroskopische Untersuchungen mit einem Nitrosyl-Äquivalent (GS-NO) des Substrates und anschließenden Dichtefunktionaltheorie-Berechnungen durchgeführt (Goudarzi *et al.*, 2018). Die Autoren haben insgesamt zehn verschiedene Ladungstransfer-Spezies identifiziert, die entweder aufgrund der Substratbindung an Eisen (Fe-S-S-R) oder Nitrosylbindung an Eisen (Fe-NO-S-R) resultierten. Überlagerungen mit den in dieser Arbeit erhobenen Spektren zeigten eine generelle und konsistente Verschiebung der Ladungstransfer-Spezies um ca. 30-60 nm gegenüber de-

nen des hETHE1. Für hETHE1 wurden die Ladungstransfer-Übergangszustände bei  $\approx 17\,800\text{ cm}^{-1}$  (entspricht 560 nm)  $22\,000\text{ cm}^{-1}$  (450 nm) und  $26\,000\text{ cm}^{-1}$  (375 nm) als verschiedene Persulfidbindungen an das Eisenzentrum interpretiert. In Anbetracht der Spektralverschiebung bei Messungen der AcPDO mit GSSH entspräche dies den hier beobachteten Spezies bei 523, 420 und 315 nm. Äquivalente zu der Ladungstransfer-Spezies bei 610 nm wurden dagegen nicht gefunden. Ladungstransfer-Spezies bei 600 nm in Anwesenheit von GSH wurden ebenfalls für das hETHE1 festgestellt und als schwache Bindung der Thiolgruppe mit  $\text{Fe}^{\text{III}}$  interpretiert (Kabil *et al.*, 2018). Eine solche Ladungstransfer-Spezies wurde für die AcPDO nach Inkubation mit GSH in UV-Vis-Spektren ebenfalls beobachtet (s. Abb. 3.18). Wurde aerobe AcPDO ( $\text{Fe-O}_2$ ) dagegen in *Stopped Flow*-Messungen mit GSSH inkubiert, war eine Ladungstransfer-Spezies bei 385 nm sichtbar, die analog zum beobachteten Elektronenübergang von Persulfid und Eisen bei 375 nm im hETHE1 auftreten könnte (s. Abb. 3.19).

Darüber hinaus wurden für hETHE1 keinerlei Eisen-Sauerstoff-Intermediate identifiziert. Für die mononukleäre  $\alpha$ -Ketoglutarat-abhängige nicht-Häm Taurin-Dioxygenase TauD wurde dagegen gezeigt, dass die Ladungstransfer-Spezies bei 318 nm einem *high-spin*  $\text{Fe}^{\text{IV}}$ -Oxo-Intermediat zuzuordnen ist, welches anschließend zu substratgebundenem  $\text{Fe}^{\text{II}}$  mit einer Absorption bei 520 nm reduziert wird (Price *et al.*, 2003). Unklar ist jedoch, ob es sich bei der Ladungstransfer-Spezies bei 523 nm tatsächlich um substratgebundenes  $\text{Fe}^{\text{II}}$  handelt, oder es sich doch um ein für Eisen-Spektren typischen *low-spin*  $\text{Fe}^{\text{II}}$ -OOH-Komplex im Bereich zwischen 500 und 550 nm handelt (Kim *et al.*, 1997, Mizoguchi & Lippard, 1998, Simaan *et al.*, 2000, Balland *et al.*, 2003). Versuche mit biomimetischen Häm-Eisen-Komplexen deuten ebenfalls auf eine Bildung eines  $\text{Fe}^{\text{IV}}$ -Oxo-Komplexes ausgehend von einer homozyklischen Sauerstoffbindung hin, die bei  $\approx 441$  nm sichtbar wird

und äquivalent zu der Ladungstransfer-Spezies bei 420 nm in AcPDO-GSSH-Gemischen sein könnte (Soper *et al.*, 2007). Anregungswellenlängen nahe des sichtbaren Niederwellenbereiches wurden für biomimetische Manganverbindungen einem Peroxo-zu-Metall-Ladungstransfer zugeordnet (Coggins *et al.*, 2013). Diese hatten einen Absorptionspeak bei 640 nm und resultierten in einer starken Grünfärbung der Lösung, wie sie auch für das AcPDO-GSSH-Gemisch beobachtet wurde (s. Abb. 3.20). Die Farbänderung könnte dabei ein Hinweis auf ein Peroxidbrücken-Intermediat sein (Coggins *et al.*, 2013). In spektroskopischen Untersuchungen an Cystein Dioxxygenasen wurden ebenfalls metastabile Intermediate identifiziert, die eine grüne Färbung der Lösung aufwiesen (Villar-Acevedo *et al.*, 2017). Die Ladungstransfer-Spezies hatten Absorptionsmaxima bei 510 und 677 nm, wobei unklar blieb, ob es sich dabei um ein Sauerstoffdonor-Addukt oder sogar um eine Fe(V)-Spezies handelt. Spezifische Peroxo-zu-Eisen-Ladungstransferspezies wurden weiterhin im sichtbaren Bereich bei  $\approx 700$  nm identifiziert (Brunold *et al.*, 1998, Skulan *et al.*, 2004).

Basierend auf Beobachtungen aus anderen Enzymen oder biomimetischen Systemen ergibt sich ein Gesamtbild der Fe-O<sub>2</sub>/S-Bindung der AcPDO, in dem der Ladungstransfer bei 325 und 420 nm einem Fe<sup>IV</sup>=O Intermediat, bei 523 nm einem Fe<sup>II</sup>-S-S-R Komplex und bei 610 nm einem Fe<sup>II/III</sup>-O-O Intermediat entsprechen könnten. Insgesamt bleibt jedoch festzustellen, dass die Zuordnung der Ladungstransfer-Spezies der AcPDO während der GSSH-vermittelten Reaktion ohne quantenphysikalische Berechnungen und/oder experimentellen Mößbauer-Spektroskopie-Daten sehr spekulativ ist.

### Oberflächen-Cysteine sind essentiell und ein Ziel für Protein-S-Glutathionylierung

Trotz eines geringen Grades an Konservierung, bezogen auf ihre jeweiligen Positionen, scheinen Cysteine wichtig für die PDO-Aktivi-

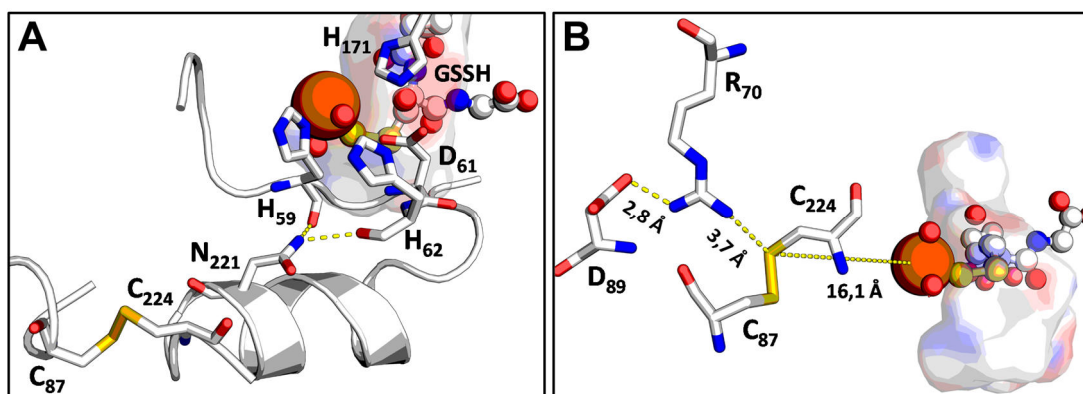
tät zu sein (Jung *et al.*, 2016). C<sub>117</sub> und C<sub>137</sub> sind die einzigen Cysteine, die in der Nähe des aktiven Zentrums lokalisiert sind. Unter ihnen ist C<sub>117</sub> in den meisten bakteriellen PDOs konserviert, wenngleich es in einigen anderen TypI-PDOs durch Serin ersetzt ist (Sattler *et al.*, 2015). In 3D-Strukturen stabilisiert das Cystein, bzw. das homologe Serin, über jeweils ein Wassermolekül die beiden His-Eisenliganden und nimmt somit eine zentrale Rolle in der sekundären Metallkoordinationsphäre ein. Der C<sub>117</sub>S Austausch besaß Enzymaktivitäten nahe des Wildtyp-Enzyms, während die Alanin-Substitution einen Aktivitätsverlust auf 10 % bewirkte (s. Kap. 3.7; Abb. 3.28). Diese Ergebnisse bestätigen die strukturell zentrale Position der SH/OH-Gruppe im nahen Wasserstoffbrückennetzwerk um das Eisenzentrum. Dagegen scheinen C<sub>137</sub> und C<sub>180</sub> keine wichtigen Funktionen einzunehmen, da deren Alanin-Austausche nur geringen Einfluss auf die Enzymaktivität zeigten.

In Bezug auf die generelle Konservierung stellt das Proteinoberflächen-assoziierte C<sub>224</sub> eine Ausnahme dar, da es in allen TypI-PDOs konserviert ist, außer in einem putativen Enzym aus *Cupriavidus pinatubonensis*. In der AcPDO-Röntgenkristallstruktur ist die C<sub>224</sub>-Thiolgruppe der aus C<sub>87</sub> zugewandt mit klar definierter, durchgängiger Elektronendichte und einem S-S-Abstand von 2 Å, was auf eine Ausbildung einer Disulfidbrücke zwischen den beiden Resten hindeutet (s. Abb. 3.31). Bereits in der Röntgenkristallstruktur der MxPDO (Sequenzidentität: 59%) lagen die beiden homologen Cysteine in unmittelbarer Nähe, jedoch nicht in Disulfidbrücken-Distanz (S-S Abstand 3,5 Å) mit klar abgegrenzter Elektronendichte (Sattler *et al.*, 2015). Das hETHE1 Homolog C<sub>247</sub> wurde in Mutagenese-Studien als essentiell für die Enzymaktivität definiert (Jung *et al.*, 2016) und zeigt in der Röntgenkristallstruktur eine zweifache Oxidationsmodifikation als Cysteinsulfinsäure, was von den Autoren als Reinigungsartefakt interpretiert wurde (Pettinati *et al.*, 2015). Interessanterweise besitzt auch C<sub>247</sub>-OOH keine klar

abgegrenzte Elektronendichte, sondern scheint direkt mit dem C<sub>87</sub>-homologen S<sub>100</sub> zu interagieren (s. Abb. 3.31). C<sub>87</sub> wurde in dieser Arbeit für die AcPDO ebenfalls als wichtig für die Enzymaktivität ermittelt, ist jedoch in vielen anderen eukaryotischen als auch bakteriellen PDOs nicht konserviert.

Nicht-reduzierende SDS-PAGE nach NEM-Behandlung zeigten Doppelbanden für das AcPDO Monomer (s. Abb. 3.30). Wurde das Protein dagegen vor der gelelektrophoretischen Trennung mit DDT reduziert war nur noch eine der beiden Banden sichtbar. Die Derivatisierung des nativen Proteins mit MalPEG resultierte in dem Auftreten von fünf Proteinbanden, jede um  $\approx 10$  kDa verschoben, wobei die kleinere der beiden Monomerbanden immer noch vorhanden war. Eine ähnliche Verschiebung war bei den einfach und doppelt derivatisierten MalPEG Proteinbanden sichtbar, sowohl mit als auch ohne Reduktion mit DTT, wobei die Zugabe von NEM die PEGylierung effektiv blockierte. Diese Ergebnisse bestätigen zum einen, dass C<sub>87</sub> und C<sub>224</sub> auch in Lösung in Teilen des nativen Proteins eine Disulfidbrücke ausbilden können und zum anderen, dass die oxidierte Form der AcPDO augenscheinlich kompakter ist und schneller in Polyacrylamidgelen migriert, unabhängig vom Grad der PEGylierung. Mehrere starke PEGylierungs-Signale im isolierten Protein ohne NEM-Vorbehandlung deuten auf eine schrittweise Modifizierung aller fünf Cysteine

hin (die Signale der Western-Hybridisierung waren zwar stärker als die Coomassie-gefärbten Banden, haben jedoch aufgrund der Peroxidase-Reaktion keine Aussagekraft bezüglich der Quantität). Die C<sub>87</sub>A und C<sub>224</sub>A Varianten zeigten dagegen eine deutliche Verschiebung zu höheren Massen, was auf eine Sättigung der Modifikation hinweist und eine bessere Zugänglichkeit der ansonsten (teilweise) geschützten Cysteine im Inneren des Proteins nahelegt (s. Anhang, Abb. S-3.1). Der Grund hierfür könnte derselbe sein, der dafür verantwortlich ist, dass das Wildtyp-Enzym in Polyacrylamidgelen schneller migriert: Die C-terminale  $\alpha$ -Helix scheint durch die Disulfidbrücke stabilisiert zu werden (Abb. 3.36 A). Atomare Verschiebungsparameter (a.d.p.s) der AcPDO-Röntgenkristallstruktur stützen diese These, da die C-terminale  $\alpha$ -Helix und Coil-Struktur hohe a.d.p.s-Werte (durchschnittlich 133,4 Å zwischen den Aminosäuren 207 und 225) besitzt und demnach flexibel zu sein scheint. Diese Flexibilität beschränkt sich nicht nur auf die AcPDO sondern ist in allen verfügbaren TypI-PDO-Kristallstrukturen vorhanden (s. Anhang, Abb. S-3.3). Eine Substitution eines der beiden Cysteine führt demnach höchstwahrscheinlich zu einer nochmals erhöhten Flexibilität um den starren Proteinkern. Dies könnte auch die Schmelzpunkte erklären, die sich in den Cystein-Varianten im Vergleich zum Wildtyp nicht ändern (s. Abb. 3.29). Mutationsanaly-



**Abbildung 3.36** | Strukturelle Darstellung der Verbindung von Oberflächen-Cysteinen und dem aktiven Zentrum der AcPDO. **A**, Disulfidbrücke, die über N<sub>221</sub> in der C-terminalen  $\alpha$ -Helix einen *active site loop* koordiniert. **B**, Abstand der Disulfidbrücke zum katalytischen Eisen mit umliegenden Säure-Base-Motiv.



sen des sich in der C-terminalen  $\alpha$ -Helix befindlichen konservierten N<sub>221</sub> stützen diese These. N<sub>221</sub> bildet Wasserstoffbrücken zu Protein-backbones von H<sub>59</sub> und H<sub>62</sub> aus. Diese befinden sich in einer *loop* im aktiven Zentrum, in dem auch D<sub>61</sub> liegt. N<sub>221</sub> ist dabei eine zentrale Aminosäure, die das Sekundärstrukturelement stabilisiert und ausrichtet (Abb. 3.36 A). Eine Substitution zu Alanin resultierte in einem fast kompletten Aktivitätsverlust ( $\approx 0,7$  % Restaktivität) auf das Niveau der Cystein-Varianten (s. Abb. 3.22). Es erscheint daher wahrscheinlich, dass die Disulfidbrücke an der äußeren Proteinoberfläche ein Redox-aktives Zentrum bildet und über N<sub>221</sub> indirekt an der Katalyse am aktiven Zentrum beteiligt ist. Ein Elektronentransfer zwischen den Oberflächen-Cysteinen und dem katalytischen Zentrum, scheint aufgrund der großen Entfernung (16,1 Å) zwar unwahrscheinlich, aber möglich, insbesondere da der Raum zwischen dem Eisenatom und der Disulfidbrücke einen durchgängigen Tunnel bildet (Abb. 3.36 B). In diesen Hohlraum ragt mit H<sub>59</sub> zwar nur ein Aromat, jedoch wurde gezeigt, dass Elektronen über eine Distanz von 15 bis 20 Å ohne weitere Beteiligung von Aromaten übertragen werden können (Gray & Winkler, 2009, Winkler & Gray, 2015). So wird für TauD vermutet, dass ein solcher Elektronentransfer Aminosäurereste des aktiven Zentrums vor Schädigungen in Folge von langsamer oder nicht erfolgreicher Substrat-Hydroxylierung schützt, indem das Elektron des stark oxidierenden Fe<sup>IV</sup>=O Intermediates auf die Proteinoberfläche übertragen wird und dort mit intrazellulären Reduktionsmitteln, wie bspw. GSH reagieren kann (Winkler & Gray, 2015). Denkbar wäre in diesem Fall ein Elektronenübertragungsweg über Fe-(H<sub>59</sub>)-C<sub>224</sub> wobei es für einen solchen Elektronentransportweg keine Evidenzen gibt und er somit für die AcPDO noch spekulativ ist.

Disulfidbrücken in Proteinen sind keine Seltenheit, auch wenn die Proteine cytoplasmatisch in *E. coli* unter reduzierenden Bedingungen produziert wurden. Zahlreiche Pro-

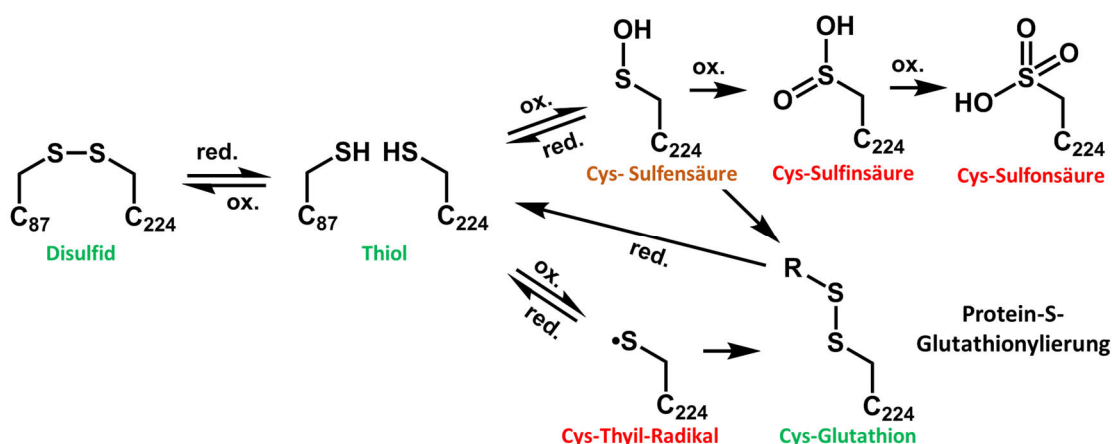
teinkristallstrukturen mit intakten Disulfidbrücken sind heutzutage in den Proteindatenbanken verzeichnet, nachdem die Proteine aus *E. coli*-Cytoplasma isoliert worden waren (z.B. Thioredoxin, 3DIE (Garcia-Pino *et al.*, 2009); artifizielle Disulfidpeptide (Pu *et al.*, 2018); humane Zn-Cu Superoxid Dismutase (Mercatelli *et al.*, 2016)). Der Anteil oxidierter gegenüber reduzierter Disulfide im Cytoplasma von *E. coli* und anderer Zellen ist abhängig von einer Kombination des Reduktionspotentials des betreffenden Disulfids, dem durchschnittlichen Reduktionspotentials im Cytoplasma (*E. coli* BL21: im Bereich zwischen -235 und -305 mV und durchschnittlich -260 mV; Zhang *et al.* (2014)), dem Verhältnis von Redox-Mediatoren (meistens aus dem GSH/GSSG-Paar;  $E_0' \approx 250 \pm 20$  mV; (Gorin *et al.*, 1975)) und dem Grad der Bildung von Cysteinsulfensäure in Proteinen durch endogenes H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und cytoplasmatische Thiolperoxidasen (Flohé, 2013, Mercatelli *et al.*, 2016). Disulfide bilden sich durch die Reaktion zwischen dem Thiol und der Sulfensäure spontan (Dalle-Donne *et al.*, 2009, Winterbourn, 2015). Thioredoxin und Glutaredoxin wirken als Antagonisten und reduzieren cytoplasmatische Disulfide in Abhängigkeit von der NADPH-Konzentration und der jeweiligen Reduktasen. Ausgehend von diesen Beobachtungen sollte das Reduktionspotential der Disulfidbrücke in der AcPDO im ähnlichen Bereich sein, sodass das Protein sowohl in oxidierter als auch in reduzierter Form vorliegen kann, übereinstimmend mit den gelelektrophoretischen und den PEGylierungs-Ergebnissen. Ähnliche Beobachtungen wurden für die humane Cystationin  $\beta$ -Synthase (CBS) gemacht (Niu *et al.*, 2018). CBS ist ein zentrales Enzym im trans-Sulfurierungsweg, der an der Umsetzung von Homocystein zu Cystein beteiligt ist. Zwei Cysteine, die ebenfalls in weiter Entfernung zum aktiven Zentrum sind ( $\approx 20$  Å) bilden eine Disulfidbrücke aus und scheinen essentiell für die Aktivität des Enzyms zu sein. Auch hier wurde gezeigt, dass der Prozess der Re-

duktion und Oxidation dynamisch ist. Das Reduktionspotential der Disulfidbrücke betrug -314 mV (pH 7,4) und ist damit etwas negativer als das cytoplasmatische Reduktionspotential von Glutathion (Dooley *et al.*, 2004, Meyer & Dick, 2010).

Die Reduktion mit TCEP führte zu einer Verringerung der AcPDO-Enzymaktivität auf  $\approx 25\%$  (s. Abb. 3.35). Weitere Derivatisierung des reduzierten Proteins mit NEM führte zu einem stärkeren Abfall der Enzymaktivität als jedes der verwendeten Agenzien für sich alleine, was darauf hindeutet, dass das gesamte Protein sensitiver gegenüber dem Inhibitor ist, wenn die Disulfidbrücke zuvor reduziert wurde. TCEP besitzt ein Reduktionspotential von ca. -290 mV und ist als ein nicht-Schwefel-basiertes Reduktionsmittel für die selektive Reduktion von Disulfidbrücken bekannt (Pullela *et al.*, 2006, Peng *et al.*, 2013), kann jedoch auch das Eisenzentrum reduzieren.

Massenspektrometrische Analysen von AcPDO Peptidfragmenten zeigten darüber hinaus, dass C<sub>137</sub> und vor allem C<sub>87</sub> nach Inkubation mit GSSH glutathionyliert vorkommen (s. Tab. 3.4). Im Fall von C<sub>87</sub> wurde eine solche Modifikation ebenfalls in geringem Ausmaß nach Inkubation mit GSH und S<sup>0</sup> beobachtet. ESI MS der jeweiligen Holoenzyme ergaben insbesondere bei den C<sub>87</sub>A und C<sub>224</sub>A Varianten Glutathion-Addukte, welche im

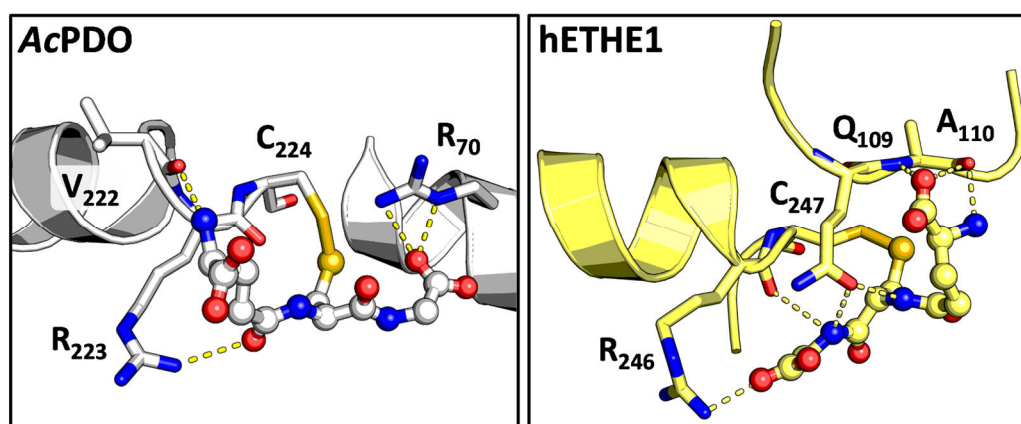
Wildtyp-Enzym nur rudimentär vorhanden waren (s. Abb. 3.31). Glutathionylierung eines der beiden Disulfid-bildenden Cystein-Reste kann dabei durch einen Thiol-Disulfid-Austausch mit GSSH erklärt werden. Im Gegensatz dazu könnte die Glutathionylierung der freien Thiole in den C<sub>87</sub>A und C<sub>224</sub>A Varianten zusätzlich auf einer Addition von GSH an einem zuvor oxidierten Cysteinsulfensäure-Rest oder einem Cystein-Thiyl-Radikal basieren (Abb. 3.37) (Dalle-Donne *et al.*, 2009, Murphy, 2012). Cystein-Oxidationen könnten beispielsweise durch die Veränderung der Proteinmasse von 27 046 Masseinheiten zu 27 078 und 27 094 Masseinheiten in den C<sub>87</sub>A und C<sub>224</sub>A Varianten angezeigt werden, die auch nach GSH/GSSH-Inkubation auftraten. Über die exakte Position der Oxidation kann jedoch nur spekuliert werden, da manche Histidin-, Tryptophan- und Methioninreste ebenfalls in den Messungen der Peptidfragmente oxidiert vorlagen (nicht gezeigt). Dies könnte demnach ein Effekt der besseren Zugänglichkeit für Oxidationsreaktionen in Abwesenheit der Disulfidbrücke sein. Einen Hinweis für die Oxidation an den Oberflächen-Cysteinen liefert die Kristallstruktur des hETHE1 und die der PDO aus *Arabidopsis thaliana*, in denen das C<sub>224</sub>-Homolog zweifach oxidiert vorkommt (McCoy *et al.*, 2006b, Pettinati *et al.*, 2015).



**Abbildung 3.37** | Darstellung von Möglichkeiten der Cystein-Modifikation in der AcPDO in Abhängigkeit reduzierender oder oxidierender Bedingungen. Grün, Zustände ohne (dauerhafte) Proteinschädigung; Rot, Zustände mit (irreversibler) Proteinschädigung.

Jung *et al.* (2016) hatten bereits Cysteine im hETHE1 gegen Serin substituiert und dabei C<sub>247</sub> als essentiell für die PDO-Aktivität eingestuft. Im Rahmen dieser Arbeit bestätigte eine C<sub>247</sub>A Variante die Ergebnisse (s. Abb. 3.28). Die Autoren hatten ebenfalls gezeigt, dass C<sub>247</sub> mit mehreren Sulfanschwefel modifiziert zu sein scheint und dies als Protein-gebundene Polysulfidierung interpretiert. Die verwendete Methode (chemische Modifikation des Proteins, gefolgt von einem Gel Shift Assay) kann jedoch nicht zwischen Cystein-gebundenem Sulfanschwefel, Disulfidbrücken oder einer Protein-S-Glutathionylierung unterscheiden. Die hier neu durchgeführten ESI MS Analysen des hETHE1 zeigten hingegen ebenfalls eine Glutathionylierung, die im Gegensatz zur AcPDO bereits im Wildtyp stark ausgeprägt ist (s. Abb. 3.34). Dies ist nicht verwunderlich, da das humane Enzym nicht in der Lage ist, Disulfidbrücken auszubilden und außerdem acht Cysteinreste enthält. Dennoch besitzt es vergleichsweise hohe Enzymaktivitäten, sodass darüber spekuliert werden kann, ob die Glutathionylierung in diesem Fall die Stabilisierung der C-terminalen  $\alpha$ -Helix über Wasserstoffbrückenbindungen zu den umliegenden Aminosäureresten übernimmt. Die Umgebung der AcPDO liefert nach molekularem Docking von GSH an C<sub>224</sub> einige potentielle Wasserstoffbrücken, die die

Koordination der C-terminalen  $\alpha$ -Helix in Abwesenheit der Disulfidbrücke zumindest teilweise übernehmen könnten (Abb. 3.38). Molekulares Docking von GSH an hETHE1-C<sub>247</sub> mit anschließender Energieminimierung zeigte ebenfalls eine Stabilisierung der C-terminalen  $\alpha$ -Helix, jedoch nicht über die analoge Helix der AcPDO, sondern über A<sub>110</sub> und insbesondere Q<sub>109</sub>, die sich in einem kristallographisch starren *loop* befinden. Aber auch R<sub>246</sub>, analog zu R<sub>223</sub> in der AcPDO, scheint an der Ausrichtung von Protein-gebundenem GSH beteiligt zu sein. Generell sind in der Umgebung der Oberflächen-Cysteine viele basische Aminosäuren angehäuft, was die Glutathionylierung favorisiert (Grek *et al.*, 2013). Eine der basischen Aminosäuren (R<sub>70</sub>) ist dabei zusammen mit D<sub>89</sub> in unmittelbarer Nähe zur C<sub>87</sub>-S-S-C<sub>224</sub> Disulfidbrücke und in fast allen Typ I-PDOs konserviert oder im Fall von R<sub>70</sub> in manchen PDOs durch Lysin substituiert. Hieraus ergibt sich ebenfalls die Möglichkeit der Glutathionylierung über eine katalytische Triade, bei der C<sub>224</sub> selbst als Nukleophil dient (Abb. 3.36 B). Das ionisierte C<sub>224</sub> stellt in der Folge einen Katalysator für die Reaktion mit Glutathion(-Persulfid), aber auch für oxidative Modifikationen, dar (Bürgisser *et al.*, 1995). Einen ähnlichen Zusammenhang zwischen einer potentiellen katalytischen Triade und Protein-S-Glutathionylierung wurde be-



**Abbildung 3.38** | Molekulares Docking von GSH an C<sub>224</sub>/C<sub>247</sub> in der AcPDO bzw. hETHE1 mit anschließender Energieminimierung. Eingezeichnet sind mögliche Wasserstoffbrücken zu benachbarten Aminosäureresten, die an der Stabilisierung der C-terminalen  $\alpha$ -Helix in Folge der Protein-S-Glutathionylierung beteiligt sein könnten.

reits für Peroxiredoxin beschrieben, konnte jedoch nie experimentell bestätigt werden (Manevich *et al.*, 2007, Zhang *et al.*, 2018).

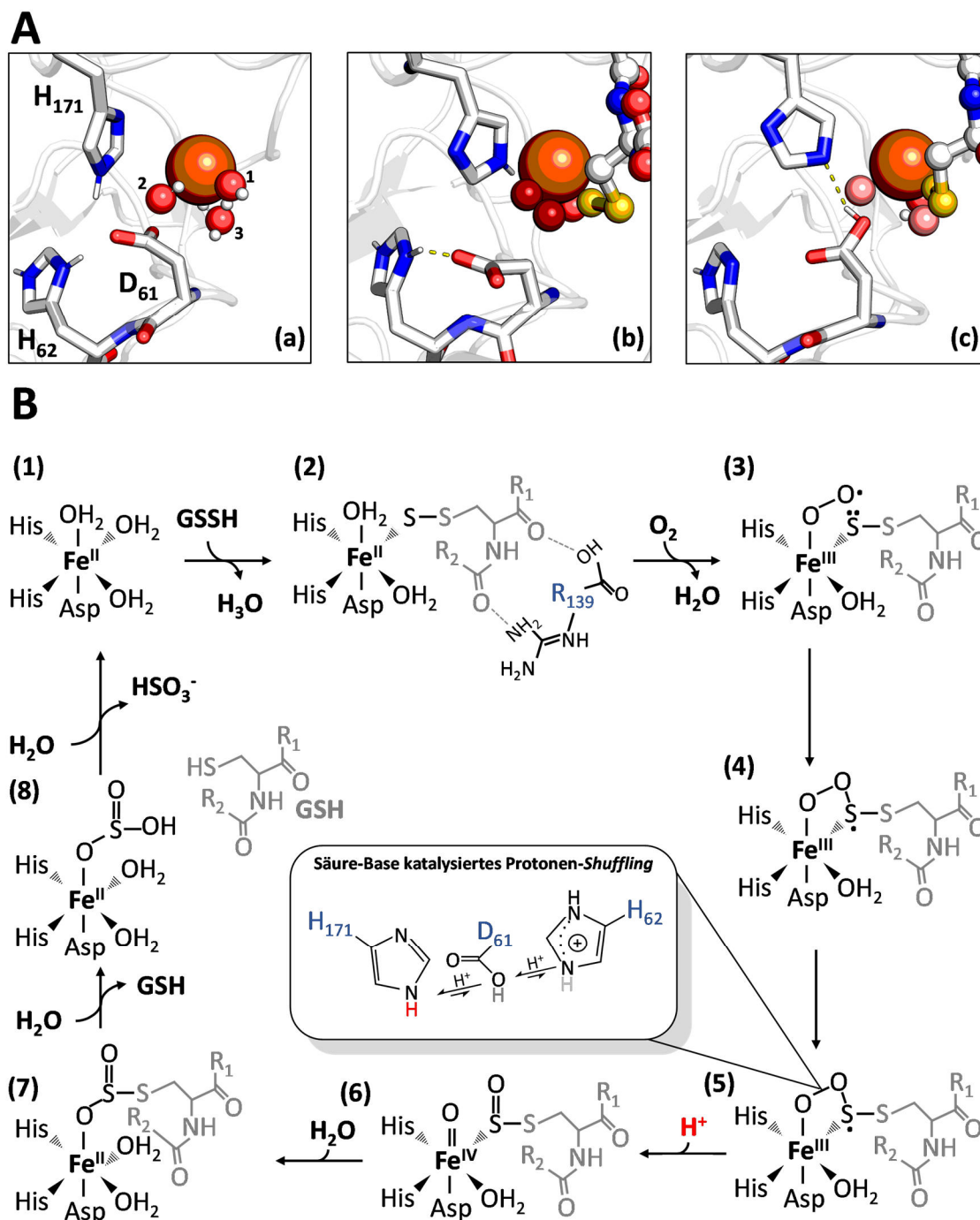
Zusammenfassend deuten die Ergebnisse daraufhin, dass die Disulfidbrücke zwischen C<sub>87</sub> und C<sub>224</sub> und/oder die Protein-S-Glutathionylierung essentiell für die Aktivität der AcPDO sind, wobei sie womöglich über N<sub>221</sub> einen essentiellen *loop* des aktiven Zentrums koordinieren.

### PDO Reaktionsmechanismus

Bislang veröffentlichte Theorien der Reaktionsmechanismen von PDOs basieren zum großen Teil auf postulierten Mechanismen von Cystein Dioxygenasen (CDOs) und Isopenicillin N Synthasen (IPNS) und fokussieren sich ausschließlich auf die Reaktion am katalytischen Eisenzentrum. Im Rahmen dieser Arbeit wurden drei Aminosäuren (D<sub>61</sub>, H<sub>62</sub> und H<sub>171</sub>) identifiziert, die essentiell für die Enzymaktivität sind und sich in unmittelbarer Nähe zum Eisenzentrum befinden (s. Kap. 3.5 und 3.6). Aufgrund der Konservierung dieser Aminosäuren in PDOs und deren Position im aktiven Zentrum liegt eine mechanistische Beteiligung der drei Aminosäurereste nahe. Darüber hinaus deuten spektroskopische Untersuchungen der AcPDO mit GSSH daraufhin, dass sich während der Katalyse ein Fe(IV)-Intermediat bildet, wie es unter anderem für CDOs postuliert und spektroskopisch begründet wurde (s. Kap. 3.4) (Tchesnokov *et al.*, 2016, Villar-Acevedo *et al.*, 2017). Basierend auf den Ergebnissen dieser Arbeit kann der bislang hypothetische PDO-Reaktionsmechanismus entsprechend modifiziert und erweitert werden (Abb. 3.39).

Das katalytische Fe(II) wird im Grundzustand von zwei Histidinen und einem Asparat, zusammen mit drei H<sub>2</sub>O in einer oktaedrischen Koordinationssphäre ligiert (1, **a**). Im ersten Schritt der Katalyse kommt es zur GSSH-Bindung an das Eisenatom (2), indem es die Position des zentralen Wasserliganden (H<sub>2</sub>O<sup>1</sup>) einnimmt. Darauf folgend wird ein weiterer Wasserligand (H<sub>2</sub>O<sup>2</sup>) durch Sauer-

stoff ersetzt unter Bildung eines Superoxo-Radikals (3). Die Sauerstoffbindung wird jedoch erst durch die Rotation von D<sub>61</sub> um sein Cβ-Atom möglich, wodurch eine geräumige Tasche für die O-O-Bindung am Eisenzentrum entsteht (**b**). Die Rekombination des Superoxo- und des Schwefelradikals des GSSH-Sulfanschwefels resultiert in einem zyklischen Peroxo-Intermediat (4). Die O-O-Bindung wird anschließend durch H<sub>171</sub> homolytisch gespalten, wobei die Protonenlücke an H<sub>171</sub> durch Säure-Base katalysiertes Protonen-Shuffling über H<sub>62</sub> und D<sub>61</sub> wieder aufgefüllt wird (5, **b**, **c**). Solche Protonen-getriebenen reduktiven Spaltungen sind in einigen Enzymen bereits als zentraler Schritt der O<sub>2</sub>-Reduktion beschrieben, beispielsweise in der Cytochrom *c* Oxidase aus *Paracoccus denitrificans* oder biomimetischen nicht-Häm Eisen-Oxo-Komplexen (Gorbikova *et al.*, 2008, Cho *et al.*, 2011). In der Folge der reduktiven O-O Spaltung entsteht ein Fe(IV)=O-Zwischenzustand, an dem weiterhin der R-SSO-Ligand gebunden bleibt (6). Für den folgenden Sauerstoffatomtransfer müssen, wie bereits von Goudarzi *et al.* (2018) postuliert, schrittweise zwei Elektronen des distalen Schwefelatoms auf das Eisen übertragen werden, um die Fe=O-Bindung aufzubrechen und eine zweite S-O-Bindung zu bilden (7). Die dioxygenierte Persulfidbindung wird anschließend in zwei aufeinanderfolgenden Schritten hydrolysiert, wodurch zunächst das Reaktionsprodukt GSH und anschließend Sulfit entsteht (8). Insgesamt wird damit deutlich, dass D<sub>61</sub> eine essentielle Rolle als kontinuierlicher Protonenüberträger zwischen H<sub>62</sub> und H<sub>171</sub> in Säure-Base-katalysierten Reaktionen während der Katalyse einnimmt, wobei vergleichbare Mechanismen häufig in aktiven Zentren von Enzymen zu finden sind (Chivers & Raines, 1997, Kumar *et al.*, 2006, Karaman & Menger, 2012). Das pH-Profil der AcPDO, welches ein Optimum bei 7,5 besitzt, bestätigt zudem die für die Katalyse notwendige, flexible Protonierung/Deprotonierung der Histidine (pK<sub>s</sub> Seitenkette: 6,0; isoelektrischer Punkt: 7,6).



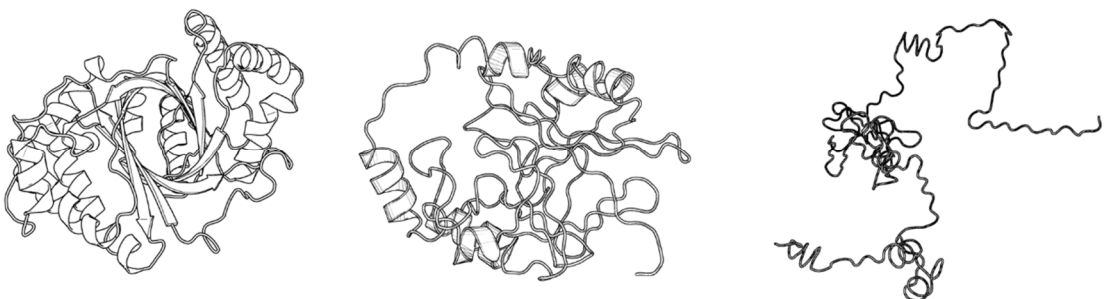
**Abbildung 3.39** | Hypothetischer Reaktionsmechanismus der PDO-Reaktion. **A**, Strukturelle Darstellung essentieller *active site* Aminosäuren mit modelliertem GSSH und Wassermolekülen (rot, a), Superoxid (dunkelrot, b) bzw. Fe(IV)=O- und RSS=O-Intermediaten (hellrot, c). Die Nomenklatur der Wassermoleküle wurde entsprechend der bereits eingeführten Nummerierung aus Kapitel 3.6, Abb. 3.27 übernommen. **B**, Intermediate während der Reaktion mit Protonenübertragungswegen im aktiven Zentrum. R<sub>1</sub> und R<sub>2</sub> des GSSH-Substrates entsprechen jeweils dem Glycin-Anteil und der Grundstruktur mit Cβ-Cγ des Glutamat-Anteils. Die GSH-Grundstruktur ist grau dargestellt.

# KAPITEL 4

## Biochemische Charakterisierung der SOR aus *Tv. paradoxus*

---

Eine Schwefel Oxygenase mit ungewöhnlich niedriger  
Reduktase-Aktivität



## Einleitung

Schwefel Oxygenasen Reduktasen (SORs) katalysieren eine sauerstoffabhängige Disproportionierungsreaktion von elementarem Schwefel mit Sulfit, Thiosulfat und Sulfid als nachweisbare Reaktionsprodukte. Das Thiosulfat: Sulfit-Verhältnis erhöht sich mit ansteigenden Temperaturen und pH-Werten, sodass es wahrscheinlich erscheint, dass Thiosulfat das Produkt einer schnellen, nicht-enzymatischen Reaktion von Sulfit mit elementarem Schwefel bei Temperaturen über 70 °C und pH-Werten über 6 ist (Kletzin, 1989, Veith *et al.*, 2012, Pöll, 2016, Rühl *et al.*, 2017). Die Oxygenase- und Reduktase-Aktivität konnte bislang in zahlreichen SOR-Mutagenese-Studien nicht voneinander getrennt werden.

Ursprünglich wurden SORs in thermoacidophilen, Schwefel-oxidierenden Archaea gefunden, die optimales Wachstum zwischen 70 und 80 °C und pH 1 und 4 zeigen (Emmel *et al.*, 1986, Kletzin, 1989, He *et al.*, 2000; s. Tab. 1.1). Später wurden *sor*-Gene ebenfalls in den Genomen mesophiler und thermophiler Bakterien, wie *Aquifex aeolicus*, *Sulfobacillus spp.* und *Acidithiobacillus spp.* identifiziert (Mangold *et al.*, 2011). Manche von ihnen wurden in *E. coli* exprimiert, wobei die entsprechenden, gereinigten Proteine vergleichbare biochemische Eigenschaften wie die archaealen SORs zeigten (Sun *et al.*, 2003, Pelletier *et al.*, 2008, Veith *et al.*, 2012, Zhang *et al.*, 2013a, Guo *et al.*, 2014). SORs zeigten alle Temperaturoptima zwischen 65 und 85 °C und pH-Optima zwischen 5 und 8,4, sogar die aus dem mesophilen Gammaproteobakterium *Halothiobacillus neapolitanus* (*HnSOR*; T<sub>Opt</sub>: 80 °C; pH<sub>Opt</sub>: 8,4; Veith *et al.*, 2012)(s. Tab. 1.1 für einen Überblick über die biochemischen Eigenschaften aller bislang charakterisierter SORs).

Bis heute wurden *sor* Gene in 35 verschiedenen Bakterien und Archaea gefunden (Rühl *et al.*, 2017; s. Abb. 1.4 für einen Überblick

des SOR-Dendrogramms) und bilden damit eine relativ kleine Proteinfamilie, die jedoch eine wichtige Rolle bei der Oxidation von elementarem Schwefel im biogeochemischen Kreislauf einnehmen. Kürzlich wurden *sor*-Gene in haloalkaliphilen *Thioalkalivibrio spp.* identifiziert. Dabei ist die SOR aus *Thioalkalivibrio paradoxus* und eine der beiden SORs aus *Tv. nitratreducens* im phylogenetischen SOR-Stammbaum tiefabzweigend, weshalb sich die Frage stellt, inwiefern diese Enzyme SOR-Aktivität besitzen oder ob die Aufteilung im Proteinstammbaum die Entwicklung einer neuen SOR-Untergruppe darstellt. Erste biochemische Untersuchungen der *TpSOR* hatten, verglichen mit anderen SORs, ähnliche proteinbiochemische Eigenschaften gezeigt, mit einem Temperaturoptimum von 80 °C bei pH 9,0 (Rühl, 2015), obwohl *Tv. paradoxus* optimale Wachstumstemperaturen von ca. 30-37 °C besitzt (s. Kapitel 7 für Details). Überraschenderweise zeigte die *TpSOR* in kolorimetrischen Nachweisreaktionen der SOR-Reaktionsprodukte nur eine geringe Reduktase-Aktivität. Struktur-basierte Sequenzalignments zeigen, dass alle bislang identifizierten SORs konservierte Bereiche besitzen unter denen sich drei Cysteine befinden (Abb. 4.1). In allen verfügbaren SOR-Kristallstrukturen ragen die Aminosäurereste der Cysteine in die *active site pocket* und standen in der Vergangenheit im Fokus von Mutagenese-Studien der archaealen SORs aus *Acidianus ambivalens* (*AaSOR*) und *Ac. tengchongensis* (*AtSOR*) (Chen *et al.*, 2005, Urich *et al.*, 2005b, Urich *et al.*, 2006, Li *et al.*, 2008, Veith *et al.*, 2012). Sowohl für *AaSOR* als auch *AtSOR* wurde gezeigt, dass eines der konservierten Cysteine (C<sub>31</sub>) essentiell für die Enzymaktivität ist, während die Mutagenese von C<sub>101</sub> und C<sub>104</sub> einen starken Abfall der Enzymaktivität zur Folge hatte, wobei hier die verbleibenden Enzymaktivitäten zwischen beiden Enzymen un-

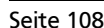
terschiedlich waren. So zeigte die C<sub>101</sub>S Variante der AaSOR eine verbleibende Enzymaktivität von ca. 1 %, während die Alanin-Variante ca. 12 % Restaktivität besaß und die C<sub>104</sub>A/S Varianten sogar durchschnittlich 15 % (Urich *et al.*, 2005b). In der AtSOR waren die Auswirkungen dagegen deutlich stärker ausgeprägt mit verbleibenden Enzymaktivitäten von 0,8 bzw. 1,6 % in den jeweiligen C<sub>101/104</sub>S-Varianten (Chen *et al.*, 2005).

Dementsprechend sollte die *TpSOR* im Rahmen dieser Arbeit zum einen im Hinblick auf ihre Temperaturoptimum und Thermostabili-

tät gegenüber den Vorarbeiten (Rühl, 2015) vertieft charakterisiert und eine chromatographische Methode zur direkten Detektion der SOR-Reaktionsprodukte nach Enzymreaktion entwickelt werden, mit besonderem Fokus auf der Reduktase-Aktivität der *TpSOR* und der allgemeine Stöchiometrie von SORs. Zum anderen sollten die homologen Cysteine der SORs aus *Thioalkalivibrio paradoxus* und *Halothiobacillus neapolitanus* substituiert und die Auswirkungen auf die Enzymaktivität ermittelt werden, um die mechanistische Rolle der konservierten Cysteine zu verstehen.

**Abbildung 4.1 (folgende Seite) |** Protein-Alignment von SOR-Sequenzen. Sequenzen wurden mittels MAFFT ausgerichtet und manuell anhand ihrer 3D-Strukturen korrigiert. Zylinder,  $\alpha$ -Helices; Pfeile,  $\beta$ -Faltblätter. Cys, Cystein Persulfid in der AaSOR; Fe, Eisenliganden; 3-f, Porenbildende Aminosäurereste der Dreifachsymmetrieachse; C<sub>101</sub>-C<sub>104</sub>, konservierte Cystein-Reste der Bindungstasche des aktiven Zentrums; schwarzer Balken, Aminosäuren in einem *loop* und einer Helix, welche an der schornsteinähnlichen Struktur der Vierfachsymmetrieachse beteiligt sind; 4-f, Porenbildende Aminosäuren der Vierfachsymmetrieachse; Pore, Aminosäuren die die Pore zum aktiven Zentrum bilden.



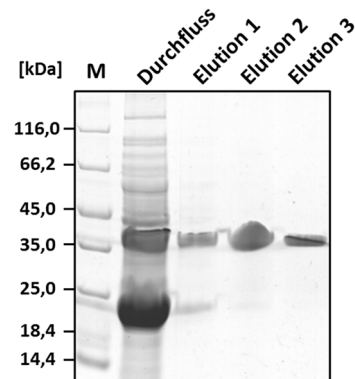


## Ergebnisse

### 4.1 Temperaturoptimum und Thermostabilität

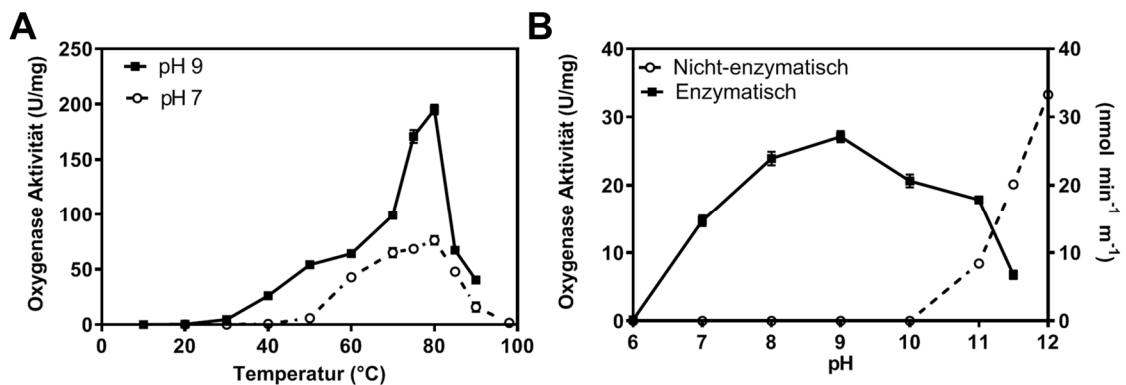
Die SOR aus *Tv. paradoxus* (*TpSOR*) wurde rekombinant in *E. coli* produziert, mit durchschnittlichen Proteinausbeuten von  $30,9 \pm 13,9$  mg lösliches Protein pro Liter Expressionskultur. Enzymaktivitätstests des Zellgesamtexttraktes belegten, dass dies  $\approx 6\%$  des gesamten löslichen Proteins in *E. coli* entspricht (nicht gezeigt). SDS-PAGE zeigte eine charakteristische Hauptproteinbande mit einer molekularen Masse von  $\approx 36$  kDa, was der Masse einer SOR-Untereinheit entspricht (Abb. 4.2). Der durchschnittliche Eisengehalt der Proteinpräparationen betrug  $0,89 \pm 0,2$  nmol Eisen pro SOR-Monomer (neun unabhängige Proteinpräparationen, je dreimal gemessen).

Die Messungen der Enzymaktivität erfolgten durch kolorimetrische Bestimmung der Produktmengen zu unterschiedlichen Zeitpunkten (Kletzin, 1989, Urich *et al.*, 2004). Um die Sensitivität und Reproduzierbarkeit der Ergebnisse zu verbessern und um nicht-enzymatische Hintergrundreaktionen stärker zu unterdrücken, wurde der ursprüngliche SOR-Aktivitätstest modifiziert. Die Optimierungen resultierten in einer kürzeren Inkuba-



**Abbildung 4.2** | Coomassie-gefärbtes 10 % Tris-Tricin-SDS-Polyacrylamidgel der *TpSOR*-Reinigung. Es wurden 25  $\mu$ g Protein des Säulendurchflusses und 10  $\mu$ g Protein für die Elutionsfraktionen aufgetragen. M, Markerproteine

tionsdauer des Enzyms und in geringeren Enzymkonzentrationen, die im Enzymtest eingesetzt werden müssen (Rühl & Kletzin, 2017). Mittels des optimierten Enzymtests wurden maximale Oxygenase-Aktivitäten der *TpSOR* von 454 U/mg Protein bei 80 °C und pH 9 erreicht. Die durchschnittlichen Oxygenase-Aktivitäten verschiedener *TpSOR* Präparationen betrugen  $323 \pm 82$  U/mg Protein ( $n = 13$  Präparationen, je dreimal gemessen). Die entsprechenden Oxygenase-Aktivitäten der *AaSOR* lagen mit dem optimierten SOR-En-



**Abbildung 4.3** | Temperatur- und pH Anhängigkeit der *TpSOR*-Enzymreaktion **A**, Temperaturprofil der *TpSOR*-Oxygenase-Aktivität bei pH 7 und pH 9. **B**, pH-Abhängigkeit der *TpSOR*-Oxygenase-Aktivität, aufgenommen bei 50 °C. Die linke y-Achse bezieht sich auf die enzymatische Produktbildung, die rechte y-Achse bildet die nicht-enzymatische Schwefeldisproportionierung ab.



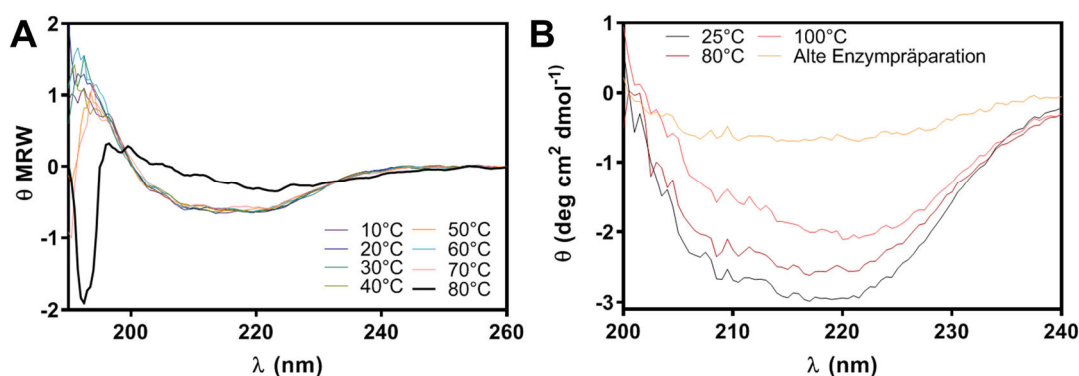
zymtest bei  $70,7 \pm 10,2$  U/mg Protein, die Reduktase-Aktivitäten entsprachen  $17,9 \pm 3,1$  U/mg Protein bei 85 °C und pH 7,2 ( $n = 8$ ). Wurden *HnSOR* Präparationen bei 80 °C und pH 8 gemessen betrugen die mittleren Oxygenase-Aktivitäten  $231,9 \pm 21,9$  U/mg Protein mit durchschnittlichen Reduktase-Aktivitäten von  $23,9 \pm 3,9$  U/mg Protein ( $n = 3$ ).

Die *TpSOR* besitzt eine Enzymaktivität in einer breiten Temperaturspanne zwischen 20 und 98 °C bei pH 7 und zwischen 10 und 90 °C bei pH 9 (Abb. 4.3 A). Betrachtet man die Enzymaktivität im Wachstumsbereich von *Tv. paradoxus*, besitzt die *TpSOR* eine Oxygenase-Aktivität von  $4,7 \pm 0,2$  U/mg Protein bei 30 °C und pH 9 bzw.  $26,1 \pm 2,6$  U/mg Protein bei 40 °C und pH 9, was einer relativen Enzymaktivität von jeweils 1,5 und 8,1 % bezogen auf das Temperaturoptimum entspricht. Um die nicht-enzymatische Schwefeldisproportionierung im alkalischen Milieu bei hohen Temperaturen zu Thiosulfat und Sulfid (Roy & Trudinger, 1970, Kletzin, 1989, Hamilton, 1991) zu minimieren, wurde das pH Profil bei 50 °C gemessen. Oxygenase-Aktivitäten wurden zwischen pH 6,0 und 11,5 mit einem Optimum bei pH 9 ermittelt (Abb. 4.3 B). Bei 50 °C wurde nicht-enzymatische Schwefeldisproportionierung bei pH 11 und höher beobachtet. Bei pH 12 konnte die Enzymaktivität

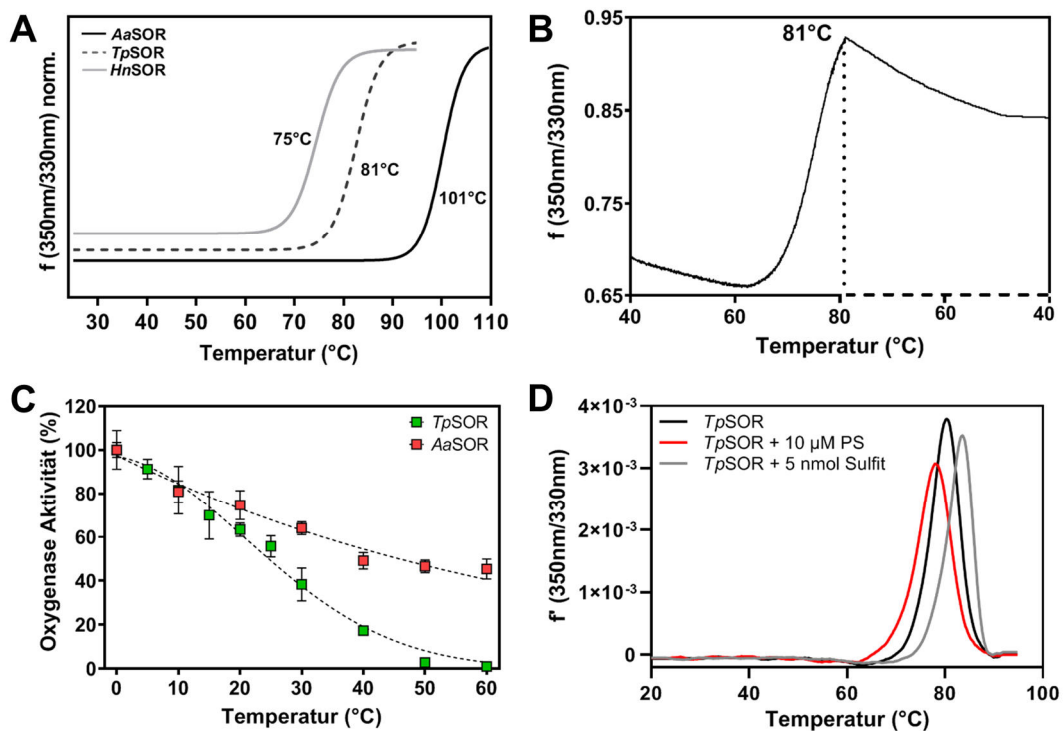
nicht mehr von der nicht-enzymatischen Hintergrundreaktion differenziert werden.

Die mittels CD-Spektroskopie ermittelte thermische Entfaltung des Proteins zeigte, bei einer Heizrate von 1 K/min, einen scharfen Übergang zwischen dem vollständig gefalteten Zustand bei 70 °C und der denaturierten Form des Enzyms bei 80 °C (Abb. 4.4 A). Wurde die *TpSOR* lediglich für 5 min bei 80 °C oder sogar bei 100 °C im Wasserbad inkubiert, resultierte dies in CD-Spektren, die auf partielle aber nicht vollständige Entfaltung des Enzyms hindeuten. Die Lagerung der *TpSOR* über einen Zeitraum von zwölf Wochen bei 4 °C hatte dagegen eine vollständige Entfaltung zu Folge (Abb. 4.4 B). Dies korreliert mit abnehmenden Enzymaktivitäten der *TpSOR* bei Lagerung von mehr als zwei Wochen bei 4 °C.

Schmelzpunkte der SOR wurden außerdem mittels *Differential Scanning Fluorimetry* Messungen (nanoDSF) bei einer Heizrate von 1K/min anhand der intrinsischen Tryptophan- bzw. Tyrosin-Fluoreszenz ermittelt. Die nanoDSF-Messungen ergaben Schmelzpunkte von 81 °C für die *TpSOR*, 75 °C für die *HnSOR* und 101 °C für die *AaSOR* (Abb. 4.5 A), was den Ergebnissen der CD-Spektroskopie sowie früheren Ergebnissen mit anderen Methoden entspricht (Urich *et al.*, 2004, Veith *et al.*, 2012). Die Denaturierung der



**Abbildung 4.4** | Temperaturstabilität der *TpSOR*, aufgenommen mittels CD-Spektroskopie. **A**, Temperaturabhängigkeit der CD-Spektren der *TpSOR* während langsamer Erhitzung (1 K min<sup>-1</sup>) zwischen 10 und 80 °C. **B**, CD-Spektren der *TpSOR* im nativen Zustand bei 25 °C, nach Vorinkubation bei 80 °C und nach Vorinkubation bei 100 °C (jeweils 5 min), verglichen mit einer für 12 Wochen bei 4 °C gelagerten Enzympräparation.



**Abbildung 4.5** | Schmelzpunkte, Thermostabilitäten und Denaturierungskinetiken von SORs. **A**, Schmelzkurven von drei SORs, gemessen mittels nanoDSF, also isothermaler Denaturierung, aufgezeichnet mit Hilfe der intrinsischen Tryptophan/Tyrosin-Fluoreszenz. **B**, Denaturierungsprofil der *TpSOR*, aufgenommen mittels nanoDSF, mit anschließender Renaturierungskinetik bei einer Heiz- und Kühlungsrate von  $1\text{ K min}^{-1}$ . **C**, Relative verbleibende Enzymaktivitäten der *TpSOR* und der *AaSOR*, nachdem sie jeweils für verschiedene Zeitspannen bei ihrem jeweiligen Temperaturoptimum inkubiert wurden. **D**, Erste Ableitungen von nanoDSF-Schmelzkurven der *TpSOR* im nativen Zustand und in Anwesenheit von Polysulfid (PS) oder Sulfid.

*TpSOR* war irreversibel, da das steigende Fluoreszenzsignal zwischen 70 und 80 °C nach anschließender Kühlung des Ansatzes bei einer Kühlrate von ebenfalls  $1\text{ K/min}$  nicht auf das initiale Fluoreszenzniveau zurückging (Abb. 4.5 B).

Um die Kinetiken der Denaturierung zu analysieren, wurden die *TpSOR* und die *AaSOR* in Abwesenheit des Substrates bei jeweils 80 °C bzw. 85 °C inkubiert. Nach verschiedenen Zeitpunkten wurde Protein entnommen, in Schwefel-haltigen Enzymtestpuffer überführt und die Enzymaktivität ermittelt. 55 % der *TpSOR*-Enzymaktivität gingen nach 25-minütiger Inkubation bei 80 °C verloren, während nur noch 1 % Restaktivität nach 60 min vorhanden war (Abb. 4.5 C). Die Denaturierung der *AaSOR* hatte eine langsamere Kinetik mit  $\approx 5\%$  verbleibender Aktivität

nach 60 min bei 85 °C (Abb. 4.5 C). Die langsame Entfaltung des Enzyms könnte dabei die optimale Enzymaktivität der *TpSOR* an ihrem Schmelzpunkt erklären. Während der ca. 5-minütigen Inkubation bei 80 °C kam es lediglich zu einem Verlust von 9,8 % der maximalen Enzymaktivität.

Interessanterweise führt die Inkubation der *TpSOR* mit Polysulfiden, dem vermutlich eigentlichen Substrat der Enzymreaktion, zu einer Destabilisierung des Enzyms um  $\approx 3\text{ °C}$ , während die Anwesenheit von Sulfid, einem Reaktionsprodukt der SOR, eine Stabilisierung um  $\approx 2\text{ °C}$  zur Folge hatte (Abb. 4.5 D). Auch wenn die meisten Enzyme eine reduzierte Sensitivität gegenüber hitzeinduzierter Denaturierung in Anwesenheit von Substrat aufweisen (Citri & Zyk, 1965, Frömmel & Höhne, 1981, Villaume *et al.*, 1990, Griesler *et al.*, 2000), sind dennoch auch umgekehrte

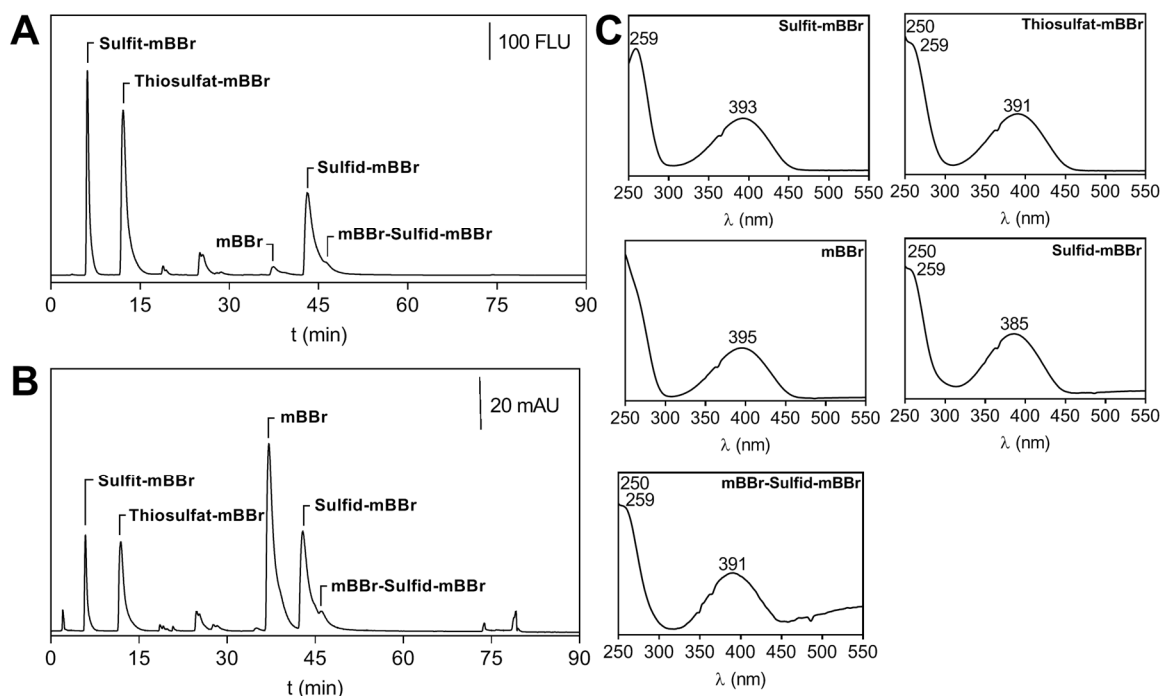
Fälle beschrieben, bei denen die Bindung eines Substrates eine Destabilisierung des Enzyms bewirken (Citri & Zyk, 1965, Sharpe & Wong, 1990, Beadle *et al.*, 1999).

## 4.2 SOR-Produktstöchiometrie

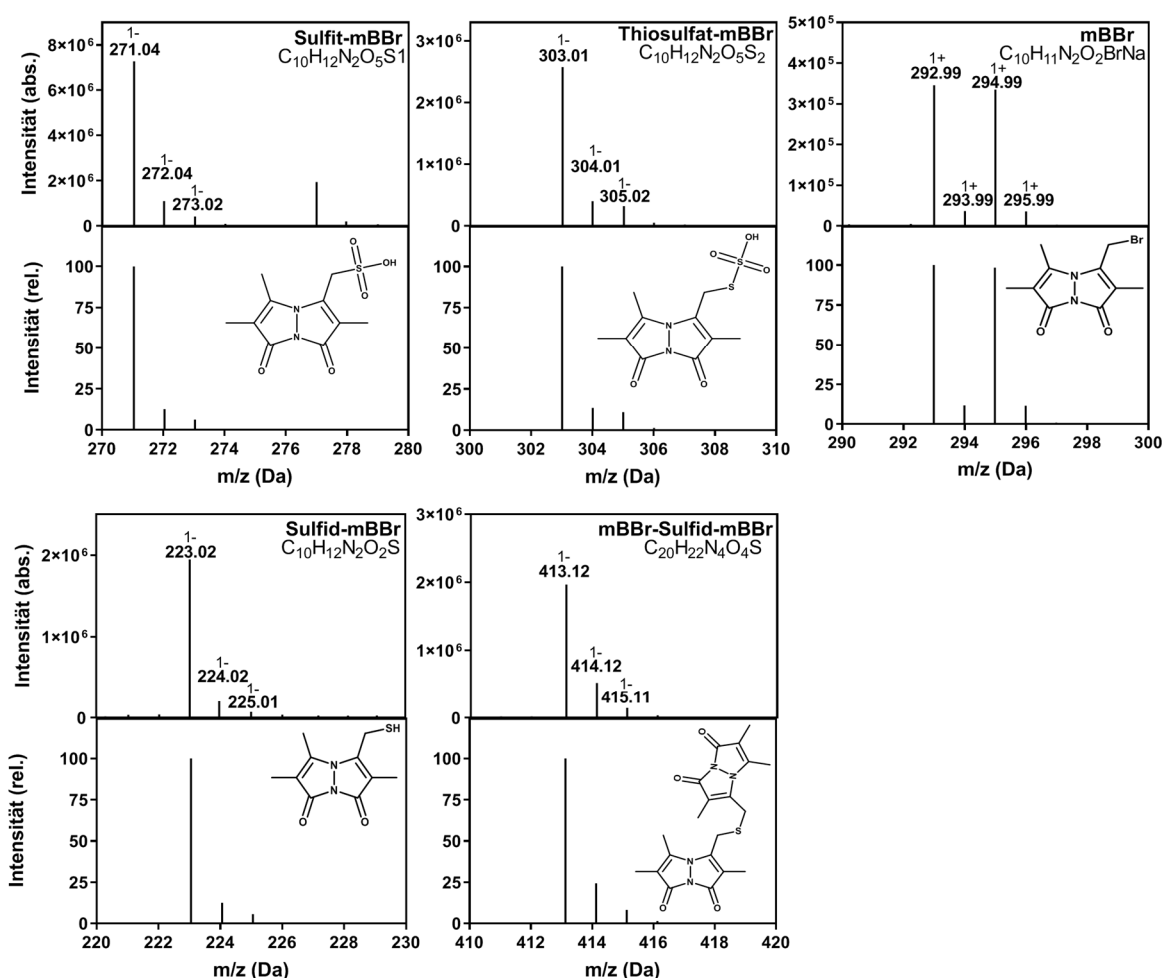
SORs besitzen normalerweise eine Stöchiometrie zwischen 4: 1 und 10: 1 von oxidierten (Sulfit + Thiosulfat) zu reduzierten (Schwefelwasserstoff/Sulfid) Produkten, wobei Oxygenase- und Reduktase- bzw. Disproportionierungsreaktionen experimentell nicht voneinander getrennt werden können. Im Gegensatz zu bisher charakterisierten SORs war die Schwefelwasserstoffproduktion der *Tp*SOR bei allen getesteten Temperaturen und pH-Werten sehr gering. Lediglich schwach ausgeprägte Färbungen waren mit kolorimetrischen Standard-Nachweismethoden für Schwefelwasserstoff nachweisbar, selbst bei Proteinkonzentrationen von bis zu 100  $\mu\text{g/ml}$ . Diese

entsprachen einer spezifischen Reduktase-Aktivität von  $\leq 0,03 \text{ U/mg Protein}$ , was einer relativen Aktivität von  $< 1 \%$  verglichen zu anderen SORs entspricht. Die Verhältnisse von oxidierten zu reduzierten Reaktionsprodukten betrugen in der *Tp*SOR zwischen 200: 1 und 1 000: 1. Die *Tp*SOR zeigte somit eine deutliche Verschiebung der Produktstöchiometrie im Vergleich zur *Aa*SOR und *Hn*SOR, bzw. eine kaum nachweisbare Schwefelreduktions-/ Disproportionierungsreaktion.

Limitierungen der kolorimetrischen Produktquantifizierungen der SOR-Reaktion stellen zum einen die Interferenz von Thiosulfat mit der Schwefelwasserstoffquantifizierung (Bildung von Methylenblau durch  $\text{H}_2\text{S}$  und Reduktion des Farbstoffes durch Thiosulfat) und zum anderen die Flüchtigkeit des Schwefelwasserstoffes dar. Aus diesem Grund war bislang noch keine exakte Bestimmung der Produktstöchiometrie der SOR-Reaktion möglich. Lediglich in Anwesenheit von Zinkacetat



**Abbildung 4.6 |** HPLC-Chromatogramme der Trennung reduzierter Schwefelverbindungen, derivatisiert mit mBBR und UV/Vis Spektren der Addukte. **A**, HPLC-Chromatogramm reduzierter Schwefelverbindungen nach mBBR-Derivatisierung, aufgenommen mit einem Fluoreszenzdetektor mit einer Anregung bei 380 nm und einer Emission bei 480 nm. **B**, UV-Chromatogramm, analog zu (A), aufgenommen bei 260 nm. **C**, UV-Vis-Spektren der jeweiligen reduzierten Schwefelverbindungen, gekoppelt an mBBR. Werte über den Graphen geben das jeweilige lokale Absorptionsmaximum in nm an.

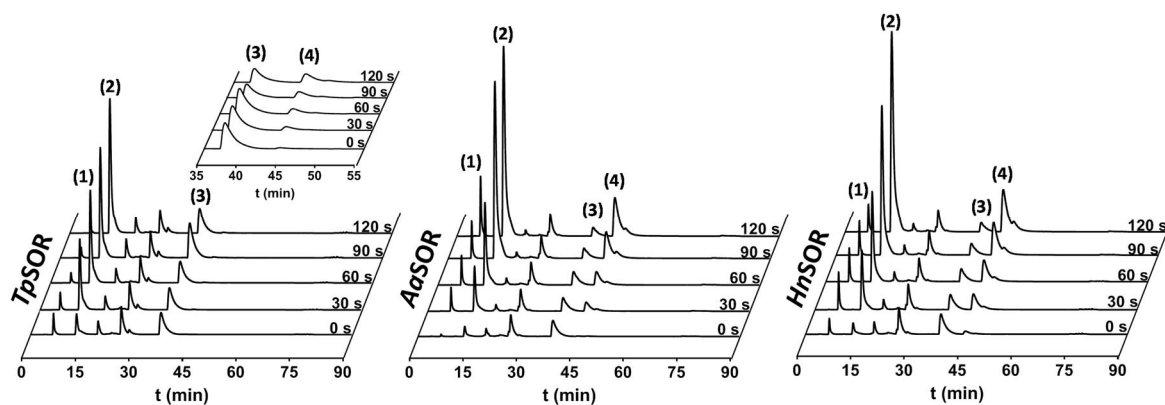


**Abbildung 4.7** | ESI-Massenspektrometrie reduzierter Schwefelverbindungen nach Derivatisierung mit mBBR nach HPLC. Obere Panels, gemessene absolute Intensitäten von Massen reduzierter Schwefelverbindungen, welche während HPLC-Läufen aufgefangen und anschließend massenspektrometrisch analysiert wurden. Zahlen über den Peaks entsprechen den tatsächlichen Massen und Ladungen der Verbindung nach ESI-MS. Untere Panels, relative Intensitäten von simulierten Massenspektren der mBBR-derivatisierten Schwefelverbindungen. Simulationen wurden mittels des Isotopenverteilungsrechners (<https://www.sis-web.com/mstools/isotope>) des Scientific Instrument Services (SIS) durchgeführt.

im Enzymtestansatz, was eine sofortige Fällung von  $H_2S$  zur Folge hat, wurde bislang eine Stöchiometrie von annähernd 1: 1 zwischen Oxygenase- und Reduktaseaktivität bestimmt, wobei Zink in Konzentrationen ab 1 mM gleichzeitig als Inhibitor der SOR-Reaktion wirkt (Kletzin, 1989).

Um die Stöchiometrie der SOR-Enzymreaktion ohne diese Limitierungen zu bestimmen, wurde ausgehend von der chromatographischen Trennung reduzierter Schwefelverbindungen aus der Studie von Rethmeier *et al.* (1997) ein HPLC-gekoppelter SOR-Enzymtest

etabliert. Hierfür wurden zunächst reine, reduzierte Schwefelverbindungen mit dem Fluoreszenzfarbstoff Monobrombiman (mBBR) derivatisiert und durch einen Gradienten aus 0,25 % Essigsäure und 100 % Methanol in der mobilen Phase auf einer C18-RP-HPLC-Säule aufgetrennt. Das charakteristische Retentionsmuster wurde sowohl mit einem gekoppelten Fluoreszenz- als auch mit einem UV-Vis-Detektor aufgezeichnet (Abb. 4.6 AB). Nach Derivatisierung mit mBBR hatte Sulfit eine charakteristische Retentionszeit von 6,1 min, Thiosulfat von 12,1 min, einfach derivatisier-



**Abbildung 4.8** | HPLC-Chromatogramme von Reaktionsprodukten nach Enzymreaktionen verschiedener SORs. Über einen Zeitraum von 120 s wurden in 30 s Intervallen die Enzymreaktion gestoppt, die Reaktionsprodukte derivatisiert und Chromatogramme aufgezeichnet. Für die *TpSOR*-Enzymreaktion wurde eine Konzentration von 1  $\mu\text{g}$  Enzym pro ml Enzymtestpuffer eingesetzt, für die *AaSOR* bzw. die *HnSOR* jeweils 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . *Inset*, Darstellung des *TpSOR*-Chromatogramms von 35 bis 55 min mit einer Enzymkonzentration von ebenfalls 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . (1) Sulfit-mBBR, (2) Thiosulfat-mBBR, (3) mBBR, (4) Sulfid-mBBR.

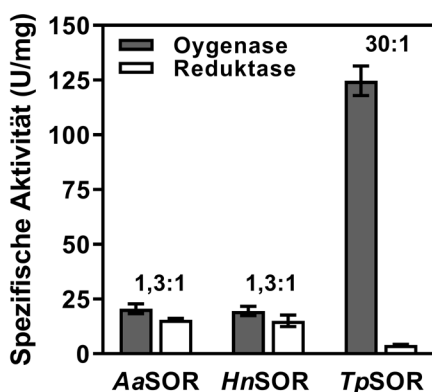
tes Sulfid von 43,1 min und doppelt derivatisiertes Sulfid von 46,3 min. Überschüssiges, nicht derivatisiertes mBBR diente der Kontrolle der ausreichenden Menge an Koppelungsfarbstoff und hatte eine spezifische Retentionszeit von 37,5 min. Für die Identifikation von nicht-derivatisierten mBBR war die Analyse des UV-Chromatogramms unentbehrlich, da ungebundener Farbstoff eine geringe Autofluoreszenz besitzt. Die mBBR-gekoppelten, reduzierten Schwefelverbindungen wiesen alle ein charakteristisches Absorptionsspektrum auf, durch das sich die jeweilige Verbindung identifizieren und die Elutionspeaks zuordnen lassen (Abb. 4.6 C).

Zur exakten Verifizierung der HPLC-Peaks wurden diese aufgefangen und massenspektrometrisch vermessen. Hierbei wurde für alle Verbindungen die erwarteten Molekülmassen mittels Elektrospray Ionisation MS gefunden und zugeordnet (Abb. 4.7). Für alle mBBR-derivatisierten Schwefelverbindungen wurde ein negativer Ionisierungszustand gewählt, während ungekoppeltes mBBR nach positiver Ionisierung identifiziert wurde.

Für den HPLC-gekoppelten SOR-Enzymtest wurde das Enzym in entsprechend vorgeheizten schwefelhaltigen Puffer gegeben, und der Ansatz analog zu den kolorimetrischen Quantifizierungen der Reaktionsprodukte (s. Kap.

2.10.10 für Details) zum Abstoppen der Reaktion in 30 Sekunden-Intervallen in ein Eisbad überführt. Der Schwefel wurde sedimentiert und der Überstand, der die reduzierten Schwefelverbindungen enthielt, für 30 min mit mBBR im Dunkeln derivatisiert. Die anschließend aufgenommenen HPLC-Spektren zeigten für alle drei SORs einen zeitabhängigen Anstieg der Reaktionsprodukte über einen Zeitraum von 2 min (Abb. 4.8). Auch mittels dieser Analysemethode war unter Standardbedingungen kein Sulfid-Peak nach der *TpSOR*-Enzymreaktion sichtbar, im Gegensatz zu den Enzymreaktionen der *AaSOR* bzw. der *HnSOR* (Konzentrationen für die Enzymreaktionen in HPLC-Standarduntersuchungen: *TpSOR*: 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ; *AaSOR*: 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ; *HnSOR*: 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ). Erst nachdem die eingesetzte Enzymmenge der *TpSOR* um das zehnfache erhöht wurde, war im HPLC-Chromatogramm ein charakteristischer Sulfid-Peak mit  $\approx 43$  min Retentionszeit vorhanden (Abb. 4.8, *TpSOR*, *Inset*), dessen Identität ebenfalls massenspektrometrisch verifiziert wurde (nicht gezeigt).

Nach Integration der Flächen der jeweiligen Peaks war eine Quantifizierung der Reaktionsprodukte möglich. Diese ergab für die *AaSOR* und die *HnSOR* eine Reaktionsproduktstöchiometrie von 1,3: 1 (Abb. 4.9). Da-



**Abbildung 4.9** | Enzymaktivitäten von SORs ermittelt durch HPLC-Analysen. Dargestellt sind die spezifischen Oxygenase- (Sulfit + Thiosulfat) und Reduktase-Aktivitäten mit Angabe der molaren Verhältnisse oxidierter und reduzierter Reaktionsprodukte. Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung biologischer Duplikate mit jeweils drei unabhängigen Messungen.

mit befindet sie sich im Bereich der kolorimetrischen Nachweisreaktionen mit Fällung von  $H_2S$  direkt im Enzymtestansatz (Kletzin, 1989) und ist deutlich ausgeglichener als in den kolorimetrischen Standardnachweisen. Das Verhältnis von nahezu 1: 1 erscheint insofern realistisch, als dass es sich bei der SOR-Reaktion um eine Oxygenase-gekoppelte Schwefel-Disproportionierungsreaktion handelt, bei der elementarer Schwefel, bzw. dessen Polysulfide, in gleichen molaren Verhältnissen oxidiert und reduziert werden. Das ca. 30 % höhere Vorkommen oxidierter Reaktionsprodukte liegt vermutlich weiterhin in der Flüchtigkeit des Schwefelwasserstoffes während der Enzymreaktion begründet.

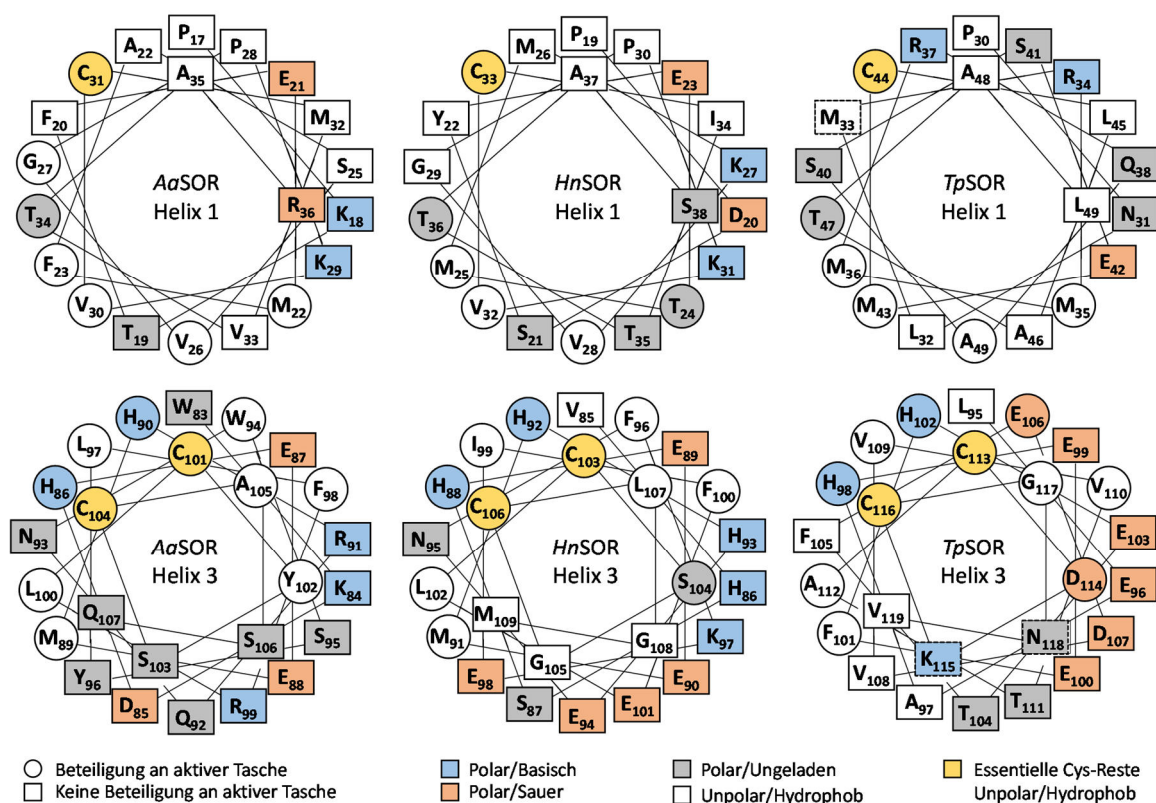
Interessanterweise wurde mit dem chromatographischen Ansatz Schwefelwasserstoffbildung der *TpSOR* nachgewiesen. Nichtsdestotrotz war diese um das ca. vierfache geringer als in der *AaSOR* bzw. der *HnSOR* (*TpSOR*: 4,1 U/mg; *AaSOR*: 15,6 U/mg; *HnSOR*: 15,1 U/mg Protein). Im Kontrast dazu besitzt die *TpSOR*, wie bereits mittels der kolorimetrischen Nachweisreaktionen nachgewiesen, eine deutlich höhere Oxygenase-Aktivität. Daraus ergibt sich ein Verhältnis von 30: 1 zwi-

schen oxidierten zu reduzierten Reaktionsprodukten, weshalb die *TpSOR* eher einer Schwefel Oxygenase, als einer typischen Schwefel Oxygenase Reduktase entspricht.

### 4.3 Mutagenesestudien

Vor Bestimmung der tatsächlichen *TpSOR* 3D-Struktur wurde ein Strukturmodell mit der *AaSOR* als *template* erstellt. Das *TpSOR*-Modell ließ sich mit einer r.m.s.d. von 0,1 auf die *AaSOR*-Röntgenkristallstruktur überlagern, wobei insbesondere Aminosäuren des aktiven Zentrums eine ähnliche generelle Ausrichtung aufwiesen (für Details zum *TpSOR*-Strukturmodell siehe Rühl, 2015). Sequenzvergleiche und das *TpSOR*-Strukturmodell hatten darauf hingedeutet, dass drei von insgesamt 40 Aminosäureresten, die in der *AaSOR* die Substratbindungstasche bilden ( $W_{94}$ ,  $Y_{102}$  und  $V_{234}$ ), in der *TpSOR* durch die sauren Aminosäurereste Glutamat oder Aspartat ersetzt sind. Vereinfachte Topologiedarstellungen zeigten, dass zwei der drei Aminosäurereste ( $W_{94}$  und  $Y_{102}$ ) in einer von zwei  $\alpha$ -Helices liegen, die einen Großteil der Bindungstasche in SORs bilden und das aktive Zentrum von der inneren Kavität trennen (Abb. 4.10). Auffällig ist, dass sich in unmittelbarer Nachbarschaft zu der *AaSOR*  $Y_{102}$ -homologen Aminosäure  $D_{114}$  in Helix 3 in der *TpSOR* weitere saure Aminosäurereste befinden, die jedoch in den Strukturvorhersagen keine direkte Beteiligung an der Bindungstasche hatten. In der *AaSOR* und *HnSOR* sind diese zum Großteil durch basische Aminosäuren ersetzt (Abb. 4.10). Außerdem kommt es in Helix 1, in der sich das essentielle  $C_{31}$  (*AaSOR* Nummerierung) befindet, in der *TpSOR* zu einem gehäuften Vorkommen hydrophober Aminosäuren, verglichen mit *AaSOR* und *HnSOR*. *AaSOR*- $W_{94}$  befindet sich zudem in direkter räumlicher Nähe zu einem der beiden konservierten Cystein-Reste der Helix 3 und ist in der *TpSOR* durch den sauren Rest  $E_{106}$  ersetzt. *AaSOR*- $V_{234}$  hingegen liegt am äußeren Ende der Bindungstasche, wobei





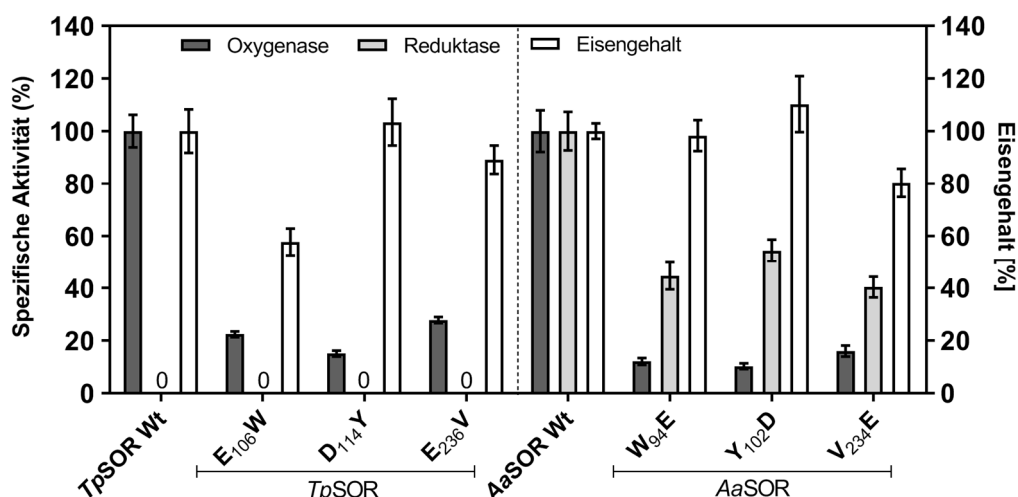
**Abbildung 4.10** | *Helical wheel* Darstellung von Aminosäuren, welche sich in zwei  $\alpha$ -Helices befinden, die einen Großteil der aktiven Tasche bilden und die konservierten Cystein-Reste beinhalten. Helix-Nummerierungen gemäß Abb. 4.1.

der Rest nicht direkt in die Bindungstasche hineinragt, sondern sich in einem Tunnelfortsatz befindet. In den Strukturvorhersagen der der *TpSOR* befindet sich an dieser Stelle ein Glutamat ( $E_{236}$ ).

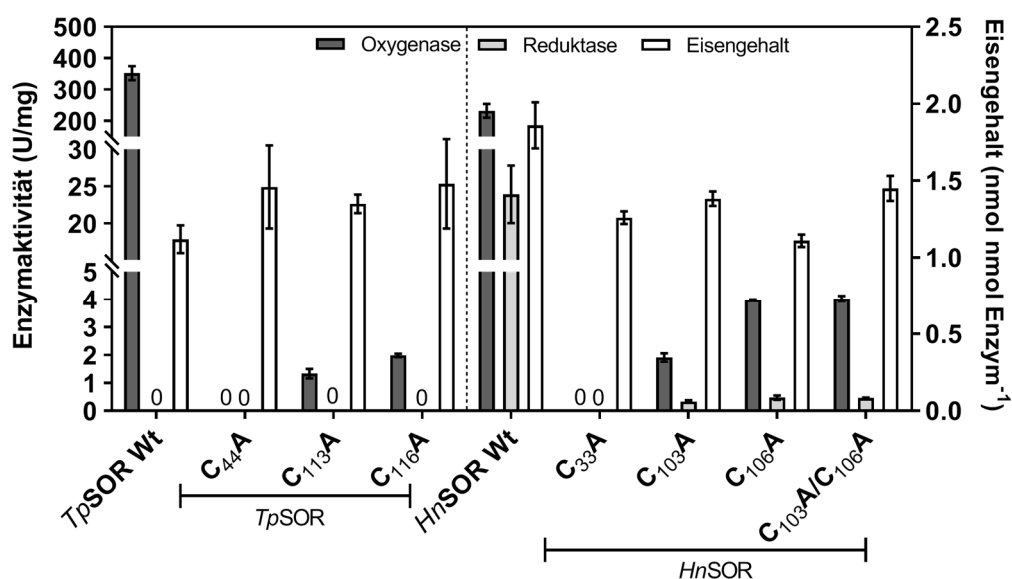
Aufgrund des vermehrten Vorkommens saurer Aminosäuren in der Bindungstasche der *TpSOR* stellte sich die Frage, ob das saure Milieu eine Ursache für die sehr geringe Reduktaseaktivität darstellen könnte. Mutagenese der *AaSOR*, bei der die entsprechenden Positionen getrennt voneinander mit Glutamat oder Aspartat substituiert wurden, wiesen eine auf 10 bis 16 % verringerte Oxygenase-Aktivität auf (Abb. 4.11). Im Gegensatz dazu verringerte sich die Reduktase-Aktivität lediglich auf 40 bis 55 % (kolorimetrisch gemessen), was zu einer Produktstöchiometrie von annähernd 1: 1 zwischen oxidierten und reduzierten Produkten führte, an-

stelle von 3: 1 bzw. 4: 1. Die komplementären Mutationen im *sor* Gen aus *Tv. paradoxus* führten zu Enzymvarianten mit verbleibenden Oxygenase-Aktivitäten von 15 bis 28 % (Abb. 4.11). Die Reduktase-Aktivitäten blieben in den kolorimetrischen Nachweisreaktionen weiterhin unterhalb der Detektionsgrenze. Dementsprechend kann daraus geschlossen werden, dass saure Aminosäurereste in der Substratbindungstasche der *TpSOR* einen Einfluss auf die Produktstöchiometrie in der *AaSOR* hatten, jedoch nicht einzeln für die geringe Schwefel-reduzierende Aktivität in der *TpSOR* verantwortlich sind.

Mutagenese des Cysteins  $C_{44}$  zu Alanin in der *TpSOR* führte zu einem kompletten Verlust der Enzymaktivität (Abb. 4.11). Gleiches wurde für die Alanin-Variante des Homologen  $C_{33}$  der *HnSOR* gemessen. Dies war bereits für das Homologe und persulfurierte  $C_{31}$  der



**Abbildung 4.11** | Relative Enzymaktivitäten von *TpSOR*- und *AaSOR*-Varianten bei denen saure Aminosäuren gegen unpolare substituiert wurden und umgekehrt. Die spezifischen Aktivitäten der Varianten sind auf die jeweiligen Wt-Proteine normiert. *TpSOR*: 100 % entsprechen einer spezifischen Oxygenase-Aktivität von 367,3 U/mg bzw. einem Eisengehalt von 1,2 nmol Fe/nmol Enzym. *AaSOR*: 100 % entsprechen einer spezifischen Oxygenase-Aktivität von 69,9 U/mg, einer spezifischen Reduktase-Aktivität von 20,6 U/mg bzw. einem Eisengehalt von 0,95 nmol Fe/nmol Enzym. Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung von biologischen Duplikaten mit jeweils drei unabhängigen Messungen.



**Abbildung 4.12** | Absolute Enzymaktivitäten von *TpSOR* und *HnSOR* Cys-Varianten. Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung von biologischen Duplikaten mit jeweils drei unabhängigen Messungen.

*AaSOR* und der *SOR* aus *Ac. tengchongensis* (*AtSOR*) nachgewiesen worden (Chen *et al.*, 2005, Urich *et al.*, 2005b). Äquivalente Enzymvarianten der ebenfalls konservierten *TpSOR*-*C113* und *-C116* resultierten in verbleibenden Oxygenase-Aktivitäten von ca. 0,5 %

im Vergleich zum Wildtyp, wobei die Reduktase-Aktivitäten weiterhin unterhalb der Detektionsgrenze blieben. Varianten der entsprechenden Reste *C103* und *C106* in der *HnSOR* führten zu Restaktivitäten von 0,8 bis 1,7 % für die Oxygenase und 1,4 bis 2,0 % für die

Reduktase (Abb. 4.12). Ebenso besaß die Variante der entsprechenden C<sub>103</sub>A/C<sub>106</sub>A Doppelmutante Restaktivitäten in ähnlicher Größenordnung. Vergleichbare Auswirkungen in Serin-Varianten der beiden Cysteine waren bereits zuvor für die AtSOR beobachtet worden (Chen *et al.*, 2005) und stehen damit

im Kontrast zu den vergleichsweise hohen Restaktivitäten der AaSOR (Urich *et al.* (2005b); Tab. 4.1). Die Ergebnisse deuten demnach auf deutlich wichtigere Rolle der konservierten C<sub>1xx</sub>-Reste für die enzymatische Reaktion in SORs hin als bisher angenommen.

**Tabelle 4.1** | Spezifische Aktivitäten verschiedener SORs und deren Cystein-Varianten.

AaSOR			AtSOR			HnSOR			TpSOR		
	Oxyg.	Redukt.		Oxyg.	Redukt.		Oxyg.	Redukt.		Oxyg.	Redukt.
Wt <sup>1</sup>	11,5	4,2	Wt <sup>1</sup>	4,8	- <sup>2</sup>	Wt <sup>1</sup>	232,0	24,0	Wt <sup>1</sup>	308,0	≤ 0,03 <sup>3</sup>
C <sub>31</sub> A	0	0	C <sub>31</sub> A	0	-	C <sub>33</sub> A	0	0	C <sub>44</sub> A	0	0
C <sub>31</sub> S	0	0	C <sub>31</sub> S	0	-	C <sub>33</sub> S	-	-	C <sub>44</sub> S	-	-
C <sub>101</sub> A	12,8	10,3	C <sub>101</sub> A	-	-	C <sub>103</sub> A	0,8	1,4	C <sub>113</sub> A	0,5	0
C <sub>101</sub> S	1,0	0,5	C <sub>101</sub> S	1,6	-	C <sub>103</sub> S	-	-	C <sub>113</sub> S	-	-
C <sub>104</sub> A	11,7	5,5	C <sub>104</sub> A	-	-	C <sub>106</sub> A	1,7	2,0	C <sub>116</sub> A	0,5	0
C <sub>104</sub> S	19,8	14,3	C <sub>104</sub> S	0,8	-	C <sub>106</sub> S	-	-	C <sub>116</sub> S	-	-
C <sub>101</sub> A/ C <sub>104</sub> A	9,7	15,3	C <sub>101</sub> A/ C <sub>104</sub> A	-	-	C <sub>103</sub> A/ C <sub>106</sub> A	1,7	1,9	C <sub>113</sub> A/ C <sub>116</sub> A	-	-
C <sub>101</sub> S/ C <sub>104</sub> S	19,9	27,9	C <sub>101</sub> S/ C <sub>104</sub> S	-	-	C <sub>103</sub> S/ C <sub>106</sub> S	-	-	C <sub>113</sub> S/ C <sub>116</sub> S	-	-
(Urich <i>et al.</i> , 2005b)			(Chen <i>et al.</i> , 2005)			Diese Arbeit			Diese Arbeit (Rühl <i>et al.</i> , 2017)		

<sup>1</sup> Absolute Aktivität in U/mg, während ansonsten relative Aktivitäten dargestellt sind.  
<sup>2</sup> Reduktase-Aktivität wurde nicht berichtet.  
<sup>3</sup> Reduktase-Aktivität des Wildtyps war ≤ 0,03 U/mg, die der Cystein-Varianten waren unterhalb der Detektionsgrenze mit den kolorimetrischen Nachweisreaktionen.

## Diskussion

*Tv. paradoxus* ist ein alkaliphiles Gamma-proteobacterium mit einer optimalen Wachstumstemperatur zwischen 30 und 37 °C (Sorokin & Kuenen, 2005, Berben *et al.*, 2015 und Kap. 7). Genomanalysen hatten ergeben, dass der Organismus eine SOR besitzt, die im phylogenetischen Proteinstammbaum tief abzweigt. Die hier angestellten biochemischen Analysen des Proteins zeigten, dass die *TpSOR* über einen weiten Temperaturbereich aktiv ist, mit einem pH-Optimum bei 9 (s. Kap. 4.1). Obwohl der cytoplasmatische pH-Wert von *Thioalkalivibrio spp.* nicht bekannt ist, entspricht das Optimum den physiologischen Bedingungen des Organismus in seinem natürlichen Habitat. Der pH-Bereich ist ähnlich zu dem der *HnSOR* (pH<sub>Opt</sub>: 8,4), wobei *Halothiobacillus neapolitanus* einen zellulären pH von ungefähr 7,8 aufweist (Tsai *et al.*, 2007, Veith *et al.*, 2012).

### Die *TpSOR* ist ein Thermozytm

Enzymaktivität wurde in der *TpSOR* in einer Temperaturspanne von 90 K detektiert, wobei dies nichts Ungewöhnliches für SORs ist. So wurde die Aktivität der *HnSOR* in einem ähnlichen Bereich ermittelt und die der *AaSOR* sogar bis 112 °C (Kletzin, 1989, Veith *et al.*, 2012, Pöll, 2016). Die *TpSOR* besitzt ein Temperaturoptimum von 80 °C, was das Enzym zu einem so genannten Thermozytm macht (s. Kap. 4.1). Interessanterweise wurde der Schmelzpunkt des Enzyms sowohl mittels CD-Spektroskopie als auch mit *Differential-Scanning-Fluorimetrie* (nanoDSF) ebenfalls bei  $\approx 80$  °C ermittelt und ist damit 20 °C geringer als der T<sub>m</sub> der *AaSOR* und im gleichen Bereich der *HnSOR*, die ebenfalls optimale Enzymaktivitäten bei 85 °C bzw. 80 °C besitzen (Kletzin, 1989, Urich *et al.*, 2004, Veith *et al.*, 2012). Die Denaturierungskinetiken der *TpSOR* waren jedoch langsam, mit einer halbmaximalen Denaturierung nach ca. 25 min. Dies erklärt womöglich auch die hohen Akti-

vitäten, da das Enzym während der enzymatischen Reaktion in Standardexperimenten maximal 7,5 min bei 80 °C inkubiert wurde (5 min Vorheizen auf die Reaktionstemperatur und bis zu 2,5 min Enzymreaktion; vgl. Kap. 2.10.14). Die hohe Stabilität von SORs mesophiler Organismen scheint dabei die Folge der ballförmigen Architektur der Proteine zu sein (Veith, 2011, Veith *et al.*, 2012). In einer vergleichenden Studie von SORs aus thermoacidophilen und moderat thermophilen Organismen wurden darüber hinaus das vermehrte Vorkommen geladener Aminosäuren wie Glutamat bei gleichzeitigem geringem Vorkommen thermolabiler Aminosäuren wie Glutamin in den jeweiligen Sequenzen, sowie die erhöhte Anzahl an Ionenpaaren, ein verringertes Verhältnis von hydrophoben zu geladenen Oberflächenbereichen und größere Volumina von inneren Kavitäten als strukturelle Basis für die Stabilität von SORs aufgeführt (You *et al.*, 2012).

### Die *TpSOR* besitzt eine ungewöhnlich niedrige Reduktase-Aktivität

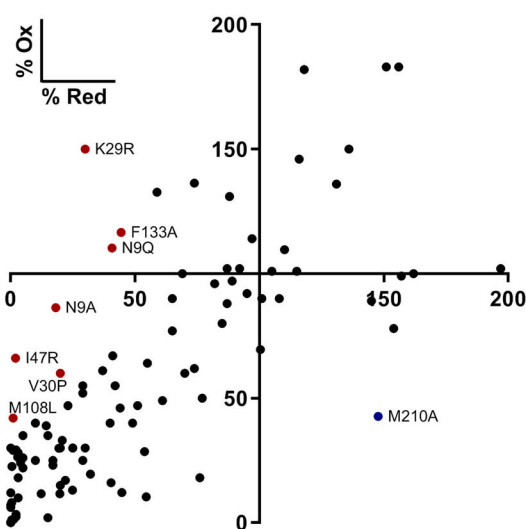
SORs katalysieren typischerweise eine sauerstoffabhängige Schwefel-Disproportionierungsreaktion mit oxidierten (Sulfit) und reduzierten (Sulfid) Reaktionsprodukten. Thio-sulfat, welches hauptsächlich während der Enzymreaktion detektiert wird, stellt dabei höchstwahrscheinlich das Produkt einer nicht-enzymatischen Reaktion von elementarem Schwefel mit Sulfit bei hohen Reaktionstemperaturen und entsprechenden pH-Werten dar (Roy & Trudinger, 1970, Kletzin, 1989, Pöll, 2016, Rühl *et al.*, 2017). Obwohl es sich bei der SOR-Reaktion um eine Disproportionierungsreaktion handelt, welche in einer 1:1 Stöchiometrie zwischen oxidierten und reduzierten Reaktionsprodukten resultieren müsste, wurde dieses Verhältnis bislang nur bei der Verwendung von Zinkacetat im Enzymtest erreicht, da Zinkacetat den leicht

flüchtigen Schwefelwasserstoff (in Lösung als Sulfid,  $\text{HS}^-$ ) direkt fixiert. Kolorimetrische Standardnachweise der Reaktionsprodukte resultierten vielmehr in Stöchiometrien zwischen 4: 1 und 10: 1, was zum einem aufgrund der Flüchtigkeit von Schwefelwasserstoff, aber auch auf die Interferenz der Schwefelverbindungen mit den Nachweisreagenzien zurückzuführen ist. So beruht die Quantifizierung von Schwefelwasserstoff auf der Bildung von Methylenblau, während Thiosulfat selbiges wiederum reduziert (Pachmayr, 1961, King & Morris, 1967).

Um die Stöchiometrie von SORs genauer zu bestimmen, wurde in dieser Arbeit, ausgehend von einer Studie von Rethmeier *et al.* (1997), ein chromatographisches Verfahren etabliert, mit dem sich reduzierte Schwefelverbindungen nach Derivatisierung mit einem Fluoreszenzfarbstoff direkt nach dem Enzymtest quantifizieren lassen (s. Kap. 4.2). Auf diese Weise ergaben sich für die AaSOR und die HnSOR Produktverhältnisse von 1,3: 1 zwischen oxidierten und reduzierten Produkten, übereinstimmend mit vorherigen Beobachtungen in Anwesenheit von Zinkacetat (Kletzin, 1989). Dagegen bestätigte sich für die TpSOR eine deutlich höhere Oxygenase-Aktivität verglichen mit den anderen SORs (ca. fünffacher Anstieg in den chromatographischen Analysen). Im Gegensatz zu den kolorimetrischen Nachweisen zeigte sich jedoch bei ausreichend hohen Proteinkonzentrationen im Enzymtestansatz eine enzymatische Sulfid-Bildung. Demnach scheint eine Reduktase-Aktivität in der TpSOR vorhanden zu sein, ist jedoch mit einem Verhältnis von ca. 1: 4 im Vergleich zu anderen SORs deutlich geringer ausgeprägt. Es ist daher wahrscheinlich, dass die Reduktase-Aktivität der TpSOR eher ein Nebeneffekt der Oxygenase-Aktivität und kein integraler Bestandteil des Reaktionsmechanismus ist.

In keiner der zahlreichen Mutagenese-Studien der AaSOR waren Enzymvarianten ohne Reduktase-Aktivität identifiziert worden (Abb. 4.13). Im Gegensatz dazu hatten ver-

schiedene Varianten, in denen der Tetramerkanal teilweise oder vollständig deletiert oder die Pore an der Dreifachsymmetrieachse vergrößert worden war, höhere Reduktase-Aktivitäten mit erhöhten Verhältnissen von Sulfid gegenüber Sulfit und Thiosulfat (Veith *et al.*, 2011). Insbesondere da die TpSOR eine vergleichsweise geringe Sequenzidentität mit anderen SORs besitzt (ca. 28 %), ist es nur schwer möglich, einzelne Aminosäuren zu identifizieren, die für die niedrige Reduktase-Aktivität verantwortlich sein könnten. Der einzig erkennbare Unterschied auf Aminosäuresequenzniveau besteht in einer Erhöhung saurer Aminosäuren im gesamten Enzym, vor allem aber auf den inneren Oberflächen, inklusive der *active site pocket*. Letztere scheint drei zusätzliche saure Aminosäurereste im Vergleich zur AaSOR zu besitzen. Mutationen, die das Ziel hatten die sauren Aminosäuren der TpSOR durch komplementäre Reste in der AaSOR zu tauschen – und umgekehrt – hatten jedoch nicht den erwarteten Effekt (s. Kap.



**Abbildung 4.13** | Übersicht aller 111 bislang aus *E. coli* gereinigten und untersuchten AaSOR Einzelmutanten in Abhängigkeit ihrer spezifischen Oxygenase- und Reduktase-Aktivitäten (Oxygenase-Aktivität auf y-Achse, Reduktase-Aktivität auf x-Achse; Stand 12/2019). Hervorgehoben sind solche Proteinvarianten, in denen es zu einer überdurchschnittlichen Verschiebung von Oxygenase- gegenüber Reduktase-Aktivität (rot) bzw. Reduktase- gegenüber Oxygenase-Aktivität (blau) kam.

4.3). Im Gegensatz dazu zeigten Varianten, in denen saure Aminosäurereste in die *AaSOR* eingefügt wurden, Stöchiometrien von nahezu 1: 1 in den kolorimetrischen Nachweisreaktionen. Komplementäre Austausche in der *TpSOR* führten dagegen ebenfalls nicht zu einer Erhöhung der Reduktase-Aktivität, sondern verringerten lediglich die Oxygenase-Aktivität. Demnach scheint die Veränderung von einer sauerstoffabhängigen Schwefeldisproportionierung, wie sie in der *AaSOR* und der *HnSOR* zu sehen ist, bis hin zu einem Enzym mit niedriger Reduktase-Aktivität, wie in der *TpSOR*, nicht auf einzelne Aminosäuren herunter zu brechen zu sein. Vielmehr sind womöglich entweder die Kombination verschiedener Aminosäuren, der generelle strukturelle Aufbau des Enzyms oder abweichende Eigenschaften des katalytischen Eisens in der *TpSOR* die Ursache für die erhöhte Oxygenase- bei simultaner Erniedrigung der Reduktase-Aktivität (s. Kap. 5 für strukturelle und spektroskopische Details der *TpSOR*).

#### **Konservierte Cysteine im aktiven Zentrum sind essentiell für die *SOR*-Aktivität**

Mutagenese-Studien der *TpSOR* verdeutlichten, dass das konservierte C<sub>44</sub> essentiell für die Enzymaktivität ist (s. Kap. 4.3). Gleiches wurde bereits für das Homologe C<sub>31</sub> der *AaSOR* beobachtet, welches in der Kristall-

struktur eine Persulfurierung aufweist (Urich *et al.*, 2005b, Urich *et al.*, 2006). Einzelmutationen der beiden anderen konservierten Cysteine C<sub>113</sub> und C<sub>116</sub> zeigten dagegen geringe Restaktivitäten von ca. 0,5 % in den entsprechenden Enzymvarianten. Im Gegensatz dazu besaßen Alanin- und Serin-Varianten der korrespondierenden Aminosäuren C<sub>101/104</sub> in der *AaSOR* zwischen 10 und 40 % Restaktivität, die auch in Doppelmutanten nicht weiter gesenkt wurde (Urich *et al.*, 2005b). Serin-Varianten der *SOR* aus *Ac. tengchongensis*, die ebenfalls Restaktivitäten von lediglich 1,6 bzw. 0,8 % besaßen (Chen *et al.*, 2005), deuteten dabei schon früher auf eine wichtigere Rolle der beiden Cysteine hin als ursprünglich angenommen. Analoge Mutagenese-Studien der *HnSOR* im Rahmen dieser Arbeit bestätigten diese Vermutung zusätzlich (s. Kap. 4.3). So hatten Alanin-Varianten der homologen Cysteine C<sub>103/106</sub> durchschnittlich lediglich 1,5 % Restaktivität, auch in der Doppelmutante.

Die Rolle der Cysteine im aktiven Zentrum, die ursprünglich als nicht-essentiell für die Enzymaktivität eingestuft wurden, muss demnach entsprechend überdacht werden. Die vorliegenden Ergebnisse lassen es als wahrscheinlich erscheinen, dass die beiden Cysteine direkt oder indirekt an der Katalyse beteiligt sind (s. Kap. 5 + 6 für weitere Details).

---

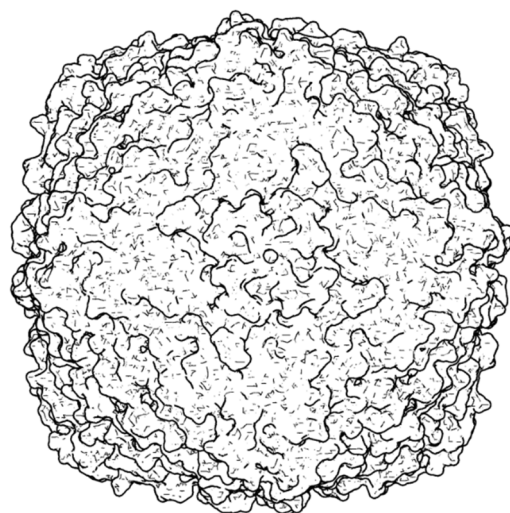


# KAPITEL 5

## Strukturbestimmungen von Schwefel Oxygenasen Reduktasen

---

Von der *Tp*SOR-Röntgenkristallstruktur zu hochauflösenden  
SOR-Kryo-EM-Strukturen



## Einleitung

Hochauflösende Proteinkristallstrukturen sind essentiell für das Verständnis der Funktionsweise von Proteinen. Die dreidimensionale Struktur gibt nicht nur Aufschlüsse über den generellen Aufbau des Proteins, sondern auch über die Ausrichtung und mögliche Modifikationen einzelner Aminosäurereste.

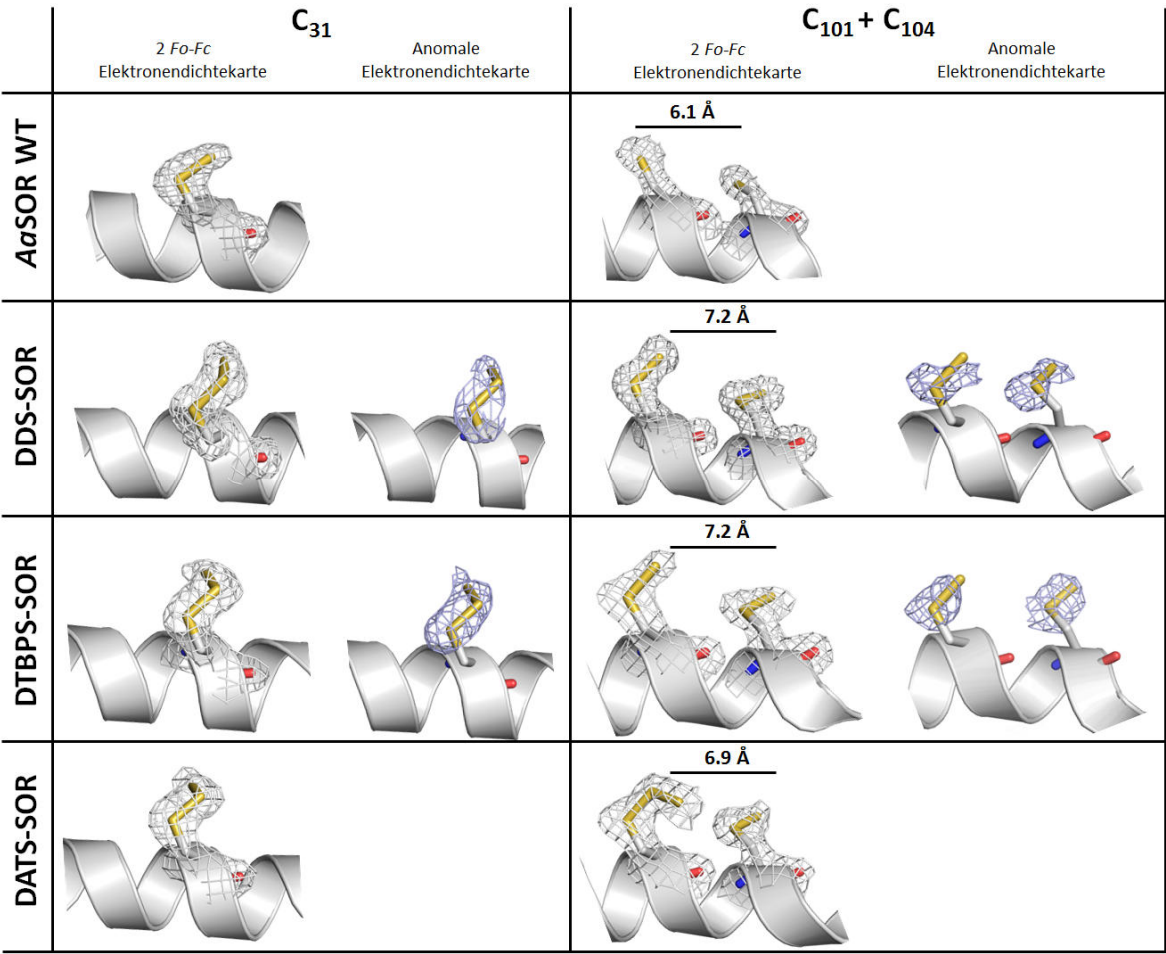
Die erste aufgeklärte Röntgenkristallstruktur eines Vertreters der SOR-Proteinfamilie war die aus *Acidianus ambivalens* (AaSOR) mit einer molekularen Auflösung von 1,7 Å (Urich *et al.*, 2006). Sie stellt gleichzeitig den am besten untersuchten SOR-Vertreter dar. Später wurden Röntgenkristallstrukturen aus dem thermoacidophilen Archaeon *Ac. tengchongensis* (AtSOR) und dem mesoalkaliphilen Gammaproteobakterium *Halothiobacillus neapolitanus* (HnSOR) mit molekularen Auflösungen von jeweils 2,7 bzw. 2,1 Å aufgeklärt (Li *et al.*, 2008, Pöll, 2016). Alle verfügbaren SOR-3D-Strukturen zeigen ballartige Kugeln mit ca. 15 nm Durchmesser und molekularen Massen von  $\approx$  845 kDa (Icosatetramere; native molekulare Masse ohne Affinitätstag). Die Holoenzyme setzen sich aus 24 identischen Untereinheiten zusammen und bilden einen geräumigen inneren Hohlraum. Jede Proteinuntereinheit besitzt ein aktives Zentrum, welches über den inneren Hohlraum des Holoenzymen erreichbar ist. Hierfür passiert womöglich das Substrat zunächst die Proteinhülle über unpolare Kanäle an der Vierfachsymmetrieachse des Holoenzymen (Tetramerkanal) und gelangt so in den inneren Hohlraum, von wo es in die 24 geräumigen *active site pockets* gelangen kann. Der wahrscheinliche Produktausgang wird wiederum von polaren Kanälen an der Dreifachsymmetrieachse des Holoenzymen (Trimerkanal) gebildet, wobei auch der Produktaustausch mit den Substratbindungstaschen über den geräumigen inneren Hohlraum verläuft (Urich *et al.*, 2006, Li *et al.*, 2008, Veith *et al.*, 2011; s.

Kap. 6 für Details zu möglichen Substrat- und Produkt-*pathways* in SORs).

Hauptstrukturgebend für die *active site pocket* sind zwei  $\alpha$ -Helices in denen sich insgesamt drei konservierte Cysteine befinden (Abb. 5.1). Eines von ihnen (C<sub>31</sub>, AaSOR-Nummerierung) ist essentiell für die Enzymaktivität und liegt in der 3D-Struktur der AaSOR persulfuriert vor (Urich *et al.*, 2005b, Urich *et al.*, 2006). Dagegen zeigte die Röntgenkristallstruktur der AtSOR keine Cystein-Modifikation (Li *et al.*, 2008), ebenso wenig wie die anfängliche Bestimmung der HnSOR-Röntgenkristallstruktur (Veith, 2011). Erst kürzlich wurde die molekulare Auflösung der HnSOR-Struktur verbessert (von 2,8 Å auf 2,1 Å), wobei in Letzterer das zu AaSOR-C<sub>31</sub> homologe C<sub>33</sub> ebenfalls eine Persulfurierung aufwies (Pöll, 2016). Darüber hinaus besaßen auch die beiden räumlich benachbarten Cysteine (HnSOR-C<sub>103</sub> und -C<sub>106</sub>) zusätzliche Elektronendichten, die auf eine Ausbildung von Tetrasulfidbrücken zwischen den beiden Aminosäureresten bzw. Persulfurierungen hindeuten, wobei die genauere Ursache bzw. Funktion noch unklar ist und Modifikationen an den beiden benachbarten Cysteinen zuvor in keiner SOR-Struktur beobachtet worden waren (Pöll, 2016). Interessanterweise waren Cystein-Modifikationen in AaSOR-Röntgenkristallstrukturen ebenfalls sichtbar, wenn das Enzym mit organischen Oligosulfiden inkubiert wurde, welche zuvor als Inhibitor identifiziert worden waren (Pöll, 2016). AaSOR-C<sub>31</sub> zeigte demnach zusätzliche Elektronendichten an seinem  $\gamma$ -Schwefelatom, was auf eine Trisulfurierung des Restes hindeutet und Persulfurierungen in den meisten Fällen an C<sub>101/104</sub> (Abb. 5.1). Lediglich nach Inkubation mit Diallyl Trisulfid war eine Trisulfurierung an C<sub>101</sub> vorhanden. Es scheint demnach wahrscheinlich, dass es sich bei der Inhibitor-vermittelten Persulfurierung um

imierte Zwischenzustände der Katalyse handelt, die den Zuständen der nativen *HnSOR*-Struktur ähneln (Pöll, 2016). Das katalytische Zentrum wird in SORs von einem mononuklearen nicht-Häm Eisenatom gebildet, das von zwei Histidinen und einem zweizähnigen Glutamat zusammen mit zwei Wassermolekülen ligiert wird. In niedrig aufgelösten SOR-Röntgenkristallstrukturen, wie der *AtSOR* (Li *et al.*, 2008) und der initialen *HnSOR*-Struktur (Veith *et al.*, 2011), ist nur eines der beiden Wassermoleküle sichtbar, was auf eine gewisse Flexibilität des zweiten Wasserliganden schließen lässt. Das Eisenzentrum wurde für die *AaSOR* spektroskopisch charakterisiert und besitzt ein niedriges

Reduktionspotential ( $E'_0$ ) von  $-268$  mV. EPR-Spektren zeigten, dass das Eisen im Oxidationszustand +III vorliegt und während des Umsatzes von elementarem Schwefel irreversibel reduziert wird (Urich, 2005). Im Rahmen von Inhibitionsstudien wurde deutlich, dass Zink, neben organischen Oligosulfiden, einen sehr wirksamen Inhibitor der SOR-Aktivität darstellt (Veith *et al.*, 2011). Untersuchungen der Röntgenkristallstruktur einer Zink-inhibierten *AaSOR* (PDB ID: 2YAV) ergaben, dass Zink nicht in unmittelbarer Nähe zum aktiven Zentrum gebunden war (Fe-Zn-Abstand  $\approx 27$  Å innerhalb der gleichen Proteinuntereinheit), sondern in einer zusätzlichen Monomer-Tasche in einem 2-His-Motiv



**Abbildung 5.1** | Modifikationen von Cystein-Seitenketten nach Inkubation der *AaSOR* mit organischen Di- und Trisulfiden in Röntgenkristallstrukturen. Die Elektronendichte wurde anhand der 1 $\sigma$ -Ebene, die des anomalen Signals anhand der 3 $\sigma$ -Ebene dargestellt. WT, Wildtyp; DDS, Dimethyl Disulfid; DTBS, Di-Tert-Butyl Polysulfid; DATS, Diallyl Trisulfid; nach Pöll (2016).

(AaSOR-H<sub>166/277</sub>) zusammen mit zwei Wassermolekülen ligiert wird (Veith *et al.*, 2011). Die Zink-inhibierte Kavität ist, ebenso wie die *active site pocket*, über den inneren Hohlraum des Holoenzym zugänglich, wobei sich der Eingang in unmittelbarer Nähe zu dem des aktiven Zentrums befindet. Getrennt werden die beiden Taschen durch die Seitenketten von AaSOR-C<sub>31</sub> und -M<sub>297</sub>. Aufgrund der großen Distanz zwischen der Zn<sup>2+</sup>-Bindungsstelle und dem S $\delta$  Atom des persulfurierten C<sub>31</sub> wurde eine direkte Interferenz jedoch ausgeschlossen.

Ziel dieser Arbeit war es, die Röntgenkristallstruktur der SOR aus *Tv. paradoxus* aufzuklären. Vergleiche mit bekannten Strukturen der AaSOR und HnSOR sollten dabei Rückschlüsse über die Ursache der niedrigen TpSOR-Reduktase-Aktivität zulassen (s. Kap. 4 für Details). Mittels EPR-Spektroskopie sollte das Eisenzentrum der TpSOR im Hinblick auf mögliche Unterschiede zur AaSOR untersucht werden. Mittels Kryo-EM sollten mögliche kovalent gebundene Reaktionsintermediate in SORs ermittelt werden. Der langsame Kristallisationsprozess in der Kristallographie kann eine Limitierung der Auflösung

von Reaktionsintermediaten darstellen, bei dem etwaige Schwefeladdukte im aktiven Zentrum abreagieren können. Co-Kristallisationsversuche verschiedener SORs sowie *soaking* mit Polysulfiden, Schwefel und SOR-Reaktionsprodukten hatten bislang keine zusätzliche Elektronendichte in der 3D-Struktur ergeben oder waren aufgrund der Instabilität des Substrates während des Kristallisationsprozesses gescheitert (Urich, 2005, Veith, 2011). Strukturauflösungen mittels Kryo-EM bieten den Vorteil, dass Proteine direkt in ihrer Konformation in Lösung schockgefroren werden. Es wird daher angenommen, dass dieser Zustand näher an ihrer nativen Konformation liegt, als nach einem Kristallisationsprozess (Shoemaker & Ando, 2018). Die Fortschritte der Elektronenmikroskopie, der Detektortechnologie und der Software für Bildverarbeitung und Prozessierung in den letzten Jahren erlauben mittlerweile die Strukturaufklärung großer Proteine auf Seitenkettenniveau inklusive Wassermolekülen und Co-Faktoren, sodass Kryo-EM dazu in der Lage ist, ein Routinewerkzeug in der Strukturbio-logie zu werden (Vonck & Mills, 2017).

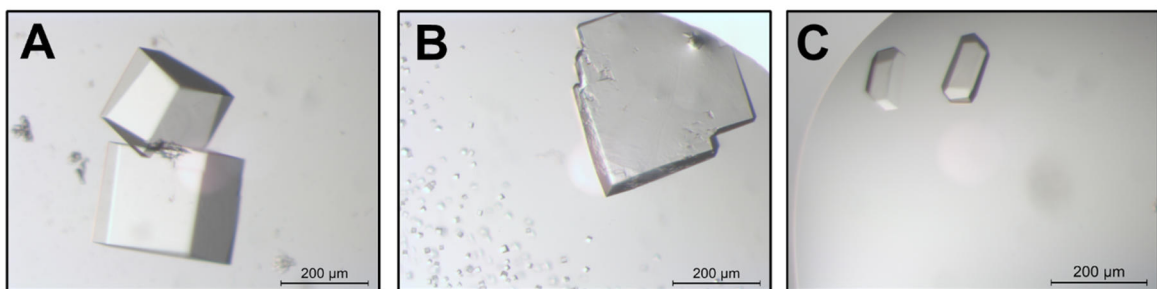
## Ergebnisse

### 5.1 Kristallisation der *Tp*SOR

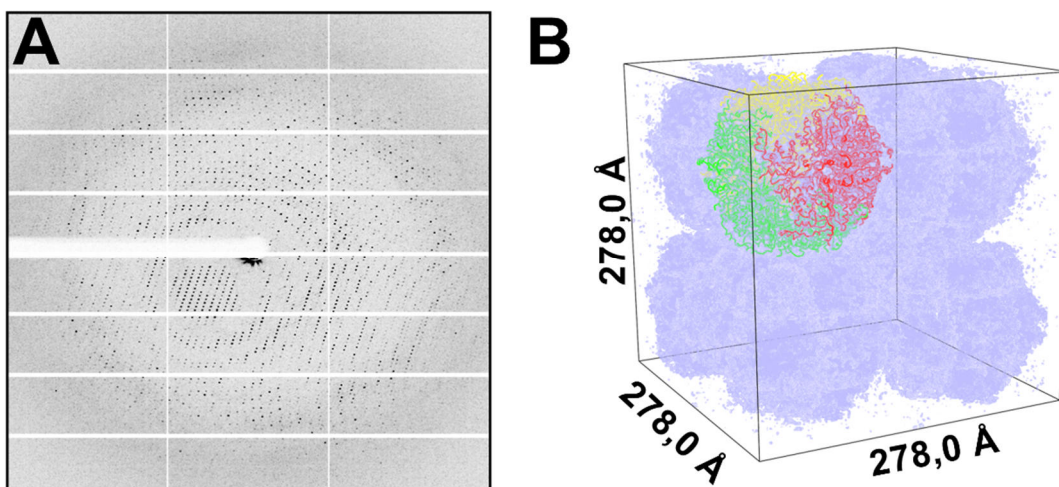
Für die Strukturbestimmung mittels Röntgenkristallographie wurde heterolog gereinigte *Tp*SOR mit einer Konzentration von 18,4 mg/ml in 50 mM Tris/HCl Puffer pH 8,5 verwendet. Initiale Kristallisationsversuche wurden bei 295 K mittels eines Kristallisations-Screening Kits mit der *sitting-drop* Dampfdiffusions-Methode durchgeführt.

Insgesamt wurden 192 verschiedene Kristallisationsbedingungen getestet, alle mit unterschiedlichen Verhältnissen von Protein- zu Kristallisationslösung. Auf diese Weise wur-

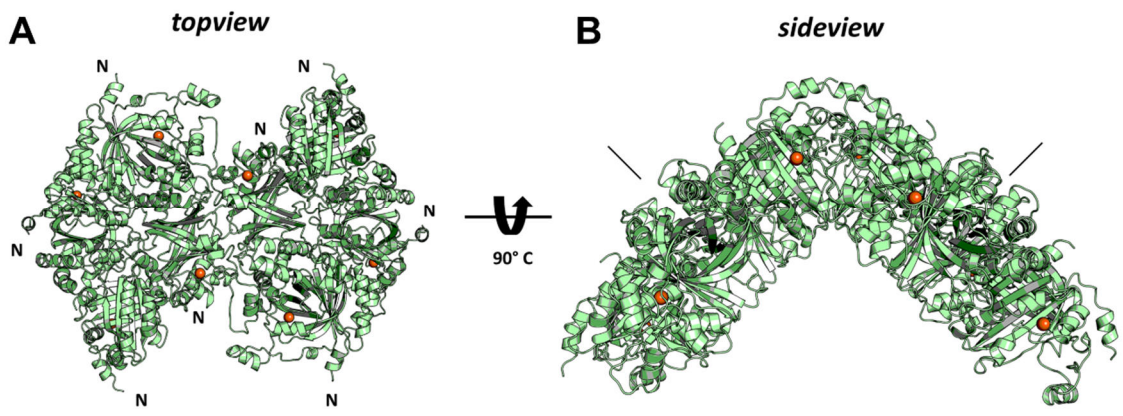
den 41 Bedingungen identifiziert, in denen innerhalb von sieben Tagen Proteinkristalle mikroskopisch sichtbar waren. Bei den meisten der Bedingungen bildeten sich kubische oder triklinische Kristalle. Unter einigen Bedingungen waren nach zwei Tagen neben kubischen Proteinkristallen große plattenförmige Kristalle am Rand des Kristallisationstropfens sichtbar. Zehn der Bedingungen wurden zur Optimierung ausgewählt und neue Kristallisationsansätze im größeren Maßstab mit abweichenden pH-Werten, Inkubationstemperaturen, Fällungsmittel- und Salzkonzentrationen mittels der *hanging-drop* Dampf-



**Abbildung 5.2** | Mikroskopische Aufnahmen verschiedener *Tp*SOR-Kristalle. **A**, Kubische Proteinkristalle, kristallisiert in Anwesenheit von 1,0 M Na-Acetat und 0,1 M Na-Kakodylat, pH 6,5. **B**, Plattenförmige Proteinkristalle, kristallisiert in 0,6 M Bernsteinsäure bzw. in 1,4 M Na-Acetat und 0,1 M Na-Kakodylat, pH 6,5. **C**, Polyedrische Proteinkristalle, kristallisiert in 0,2 M Li-Sulfat, 0,1 M Tris, pH 8,5 und 40 % (w/v) PEG 400.



**Abbildung 5.3** | Röntgenbeugung und Raumgruppe der *Tp*SOR. **A**, Exemplarisches Röntgenbeugungsbild eines *Tp*SOR-Kristalls in der Raumgruppe  $I23$  mit einer Auflösung von  $\approx 2,8$  Å. **B**, Darstellung der *Tp*SOR-Einheitszelle mit Elektronendichte und drei kristallographisch asymmetrischen Einheiten.



**Abbildung 5.4** | Darstellung der asymmetrischen Einheit der *TpSOR*-Kristallstruktur. **A**, Aufsicht mit verlängertem N-Terminus und katalytischen Eisenatomen (orangene Kugeln). **B**, Seitenansicht mit eingezeichneten Tetramerkanälen an der Vierfachsymmetrieachse.

diffusions-Methode erstellt. Unter vier der Bedingungen bildeten sich innerhalb von drei Tagen Kristalle mit einer Größe von 150 – 500  $\mu\text{M}$  verschiedener Morphologie (Abb. 5.2). Die Proteinkristalle wurden nach 3 – 10 Tagen in kryoprotektive Lösungen überführt (Kristallisationslösung + 30 – 35 % Glycerin; s. Kap. 2, Tab. 2.7) und in flüssigem Stickstoff gefroren. Analysen der Röntgendiffraktion ergaben, dass die meisten der Proteinkristalle in der kubischen Raumgruppe  $I432$  (*International Tables for Crystallography*, Nr. 211; Hahn *et al.* (1983)) kristallisierten. All diese Proteinkristalle zeigten jedoch so genannte *twinning* Effekte. Kristallisationszwillinge treten auf, wenn eine Einheitszelle eine höhere Symmetrie aufweist, als die Raumgruppe der Kristallstruktur suggeriert. Während des Kristallisationsprozesses entstehen dabei zwei (oder mehr) unabhängige Nukleationspunkte, bei der die zwei Proteinkristalle im späteren Verlauf zusammenwachsen. Dies resultiert in einem diffusen Diffraktionsmuster. Das Auftreten von Kristallzwillingen stellt keinen ungewöhnlichen Effekt in der Kristallographie dar, erschwert jedoch die Strukturauflösung oder macht diese gänzlich unmöglich (Chandra *et al.*, 1999, Dauter, 2003, Parsons, 2003). Auch die Kristallisation in Anwesenheit verschiedener Additive (*Additive*

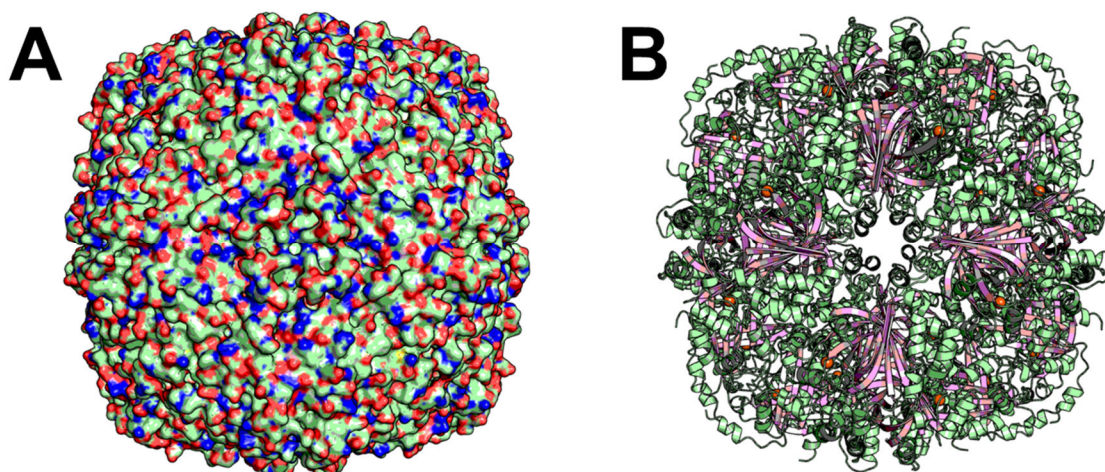
*Screen HR2-428 Reagent Formulation*) führte nicht zu einer geordneten, mononuklearen Kristallisation ohne Bildung von Kristallzwillingen.

Große plattenförmige Proteinkristalle mit Ausmaßen von ca. 400 x 400  $\mu\text{m}$ , die in Anwesenheit von 1,4 M Natrium-Acetat und

**Tabelle 5.1** | Kristallographische Parameter, Röntgendiffraktionsdaten und *Refinement*-Statistiken der *TpSOR*-Kristallstruktur. Werte in Klammern beziehen sich auf die Schale mit der höchsten Auflösung.

	<i>TpSOR</i> Wt
Datenerfassung	DLS I03
Raumgruppe	$I23$
Wellenlänge (Å)	1,7373
Auflösung (Å)	80,26-2,84 (3,01-2,84)
Einheitszellparamter (Å)	a=b=c=278,03
Anzahl der individ. Intens.	83 503
Multiplizität	34,8
$I / \sigma(I)$	2,3 (0,87)
$R_{\text{sym}}$ (%)	30,6 (8,1-388,2)
$R_{\text{meas}}$ (%)	31,0 (8,2-393,9)
$R_{\text{pim}}$ (%)	7,27 (29,3)
Vollständigkeit (%)	99,9 (99,6)
Wilson B Faktor (Å <sup>2</sup> )	60,01
<b>Refinement</b>	
Moleküle / asym. Einheit	8
Aminos. / Kette (gesamt)	311 (2 488)
Anzahl von Wassermol.	14
Anzahl von Eisenatomen	8
$R_{\text{work}}$ (%) / $R_{\text{free}}$ (%)	0,1994 / 0,2328
Durchschn. ADP <sup>2</sup> (Å)	90,4
Bindungen r.m.s.d. (Å)	0,034
Winkel r.ms.d. (°)	2,192

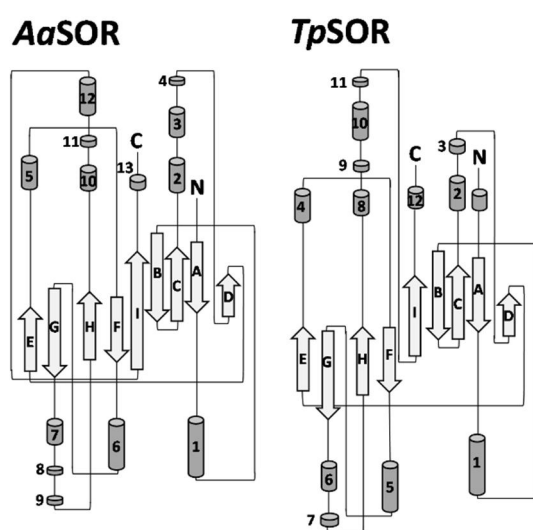




**Abbildung 5.5** | Darstellung des *TpSOR* Holoenzym. **A**, Oberflächendarstellung mit Aufsicht auf die Vierfach-symmetrieachse. Stickstoff- (blau), Sauerstoff- (rot), und Kohlenstoffatome (grün) sind koloriert. **B**, Cartoon-Darstellung mit kolorierten  $\alpha$ -Helices (grün),  $\beta$ -Faltblättern (rosa) und Eisenatomen (braune Kugeln).

0,1 M Natrium-Kakodylat bei pH 6,5 gewachsen waren, wiesen im Gegensatz dazu keine *twinning* Effekte auf und kristallisierten in der kubischen, raumzentrierten Raumgruppe *I* 2 3 (*International Tables for Crystallography*, Nr. 197; Hahn *et al.* (1983) Abb. 5.3 A; Tab. 5.1). Die *TpSOR*-Proteinkristalle wurden mit Wellenlängen von 0,976 und 1,737 Å gemessen. Die Elementarzelle der Kristalle hatte die

Dimensionen  $a=b=c=278,2$  Å mit einem Gesamtvolumen von  $2,2 \times 10^7$  Å<sup>3</sup> (Abb. 5.3 B). Das Phasenproblem wurde durch *molecular replacement* mit der *AaSOR* als Suchmodell gelöst (PDB ID: 2CB2, Ulrich *et al.* (2005a); Sequenzidentität: 32 %). Die *TpSOR* kristallisierte mit einer Auflösung von 2,84 Å mit jeweils acht Proteinuntereinheiten in der kristallographisch asymmetrischen Einheit (Abb. 5.4; Tab. 5.2). Drei der asymmetrischen Einheiten lagerten sich dabei zu dem aus 24 Untereinheiten bestehenden Holoenzym mit nicht-kristallographischer 432-Punktgruppensymmetrie zusammen, wodurch sich in einer Elementarzelle acht *TpSOR*-Holoenzyme befinden (Abb. 5.3 B). Die Gesamtoberfläche der asymmetrischen Einheit in einer Elementarzelle beträgt 95 911,8 Å<sup>2</sup> bei einer durchschnittlichen Fläche von 11 988,5 Å<sup>2</sup> pro Untereinheit (berechnet mittels AREAIMOL aus der CCP4 Suite; Winn *et al.* (2011)). Die Struktur beinhaltet die Aminosäuren 3 – 313, wobei C-terminal lediglich der flexible Strep-Tag keiner Elektronendichte zugeordnet werden konnte (Tab. 5.2). Die N-terminalen Aminosäuren Methionin und Asparagin sind ebenfalls nicht in der Struktur nachweisbar, ähnlich wie in der Kristallstruktur der *HnSOR*, in

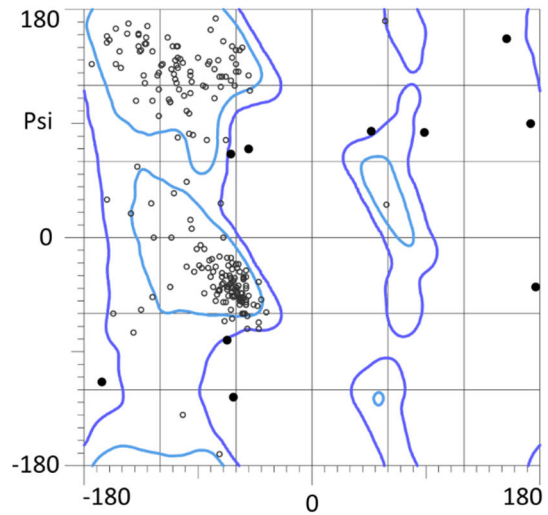


**Abbildung 5.6** | Darstellung der Proteintopologie der *AaSOR* und der *TpSOR*.  $\alpha$ -Helices sind als Zylinder,  $\beta$ -Faltblätter als Pfeile dargestellt.



der die drei N-terminalen Aminosäuren fehlen (Pöll, 2017). Die Abspaltung des N-terminalen Methionins kommt in ca. 2/3 aller Proteine vor (Giglione *et al.*, 2004) und wurde für die AaSOR bereits als posttranslationale Modifikation beschrieben (Kletzin, 1992).

Der im Vergleich zur AaSOR und HnSOR verlängerte N-Terminus ist in der TpSOR-Struktur deutlich sichtbar und ragt aus den Untereinheiten heraus (Abb. 5.4 A). Durch die Verlängerung liegt dieser nicht in direkter räumlicher Nähe zum C-Terminus, wie es bei den bisherigen SOR-Strukturen der Fall ist (Abstand C- zu N-Terminus: 34,0 Å gegenüber 6,2 Å in der AaSOR bzw. 6,9 Å in der HnSOR), und lagert sich mit seiner kurzen Helix seitlich an die Proteinoberfläche an. Dort ist er über zwei Salzbrücken mit dem starren Körper des Holoenzym verankert und verleiht der TpSOR somit ihre „eckigere“ Erscheinung. Interessanterweise beinhaltet jede kristallographisch, asymmetrische Einheit jeweils zwei vollständige Tetramerkanaäle (Abb. 5.4 B), welche die Vierfachsymmetrieachse des Enzyms bilden. Das TpSOR Holoenzym hat einen Durchmesser von ca. 14,1 Å (Abb. 5.5) und ist damit etwas kleiner als die AaSOR (15,2 Å). Der innere Hohlraum weist dagegen keine signifikante Verkleinerung gegenüber der AaSOR auf, weshalb augenscheinlich ein in der TpSOR verkürzter Tetramerkanal die Ursache für den geringeren Enzymdurchmesser darstellt (s. Kap. 6 für weitere Details zum



**Abbildung 5.7 |** Ramachandran-Diagramm der TpSOR Kristallstruktur. Dargestellt sind die  $\psi$ - und  $\phi$ -Torsionswinkel der A-Untereinheit und deren Einteilung in energetisch favorisierte und energetisch günstige Konformation (hellblaue bzw. dunkelblaue Umrandung).

Tetramerkanal). Wie für SORs typisch besitzen die TpSOR-Untereinheiten zentrale  $\beta$ -barrel-Strukturen, die von  $\alpha$ -Helices umgeben sind (Abb. 5.5 B + 5.6) und ordnen sich damit in die Klasse der  $\alpha\beta$ -Proteine ein (Levitt & Chothia, 1976). Vergleiche der Proteintopologie zwischen TpSOR und AaSOR bestätigen die zentrale Rolle der  $\beta$ -barrel-Struktur mit neun antiparallel angeordneten  $\beta$ -Faltblättern, umgeben von 13  $\alpha$ -Helices (Abb. 5.6).

**Tabelle 5.2 |** Vergleiche von SOR-Kristallisationsparametern.

	<i>TpSOR</i>	<i>AaSOR</i>	<i>HnSOR</i>
<b>PDB ID</b>	-	2CB2	6QPA
<b>Auflösung (Å)</b>	2,8	1,7	2,1
<b>Asymmetrische Einheit</b>	8	6	24
<b>Aminosäuren pro Untereinheit</b>	3-313	2-308	4-313
<b>(Gesamt <sup>1</sup>)</b>	(1-313)	(1-309)	(1-314)
<b>r.m.s.d. (Å) <sup>2</sup></b>	-	1,07	0,90
<b><math>\alpha</math>-Helices (%)</b>	39,2	35,9	26,7
<b><math>\beta</math>-Faltblätter (%)</b>	28,3	30,4	31,6
<b>Referenz</b>	Diese Arbeit	Urich <i>et al.</i> (2006)	Pöll (2016)

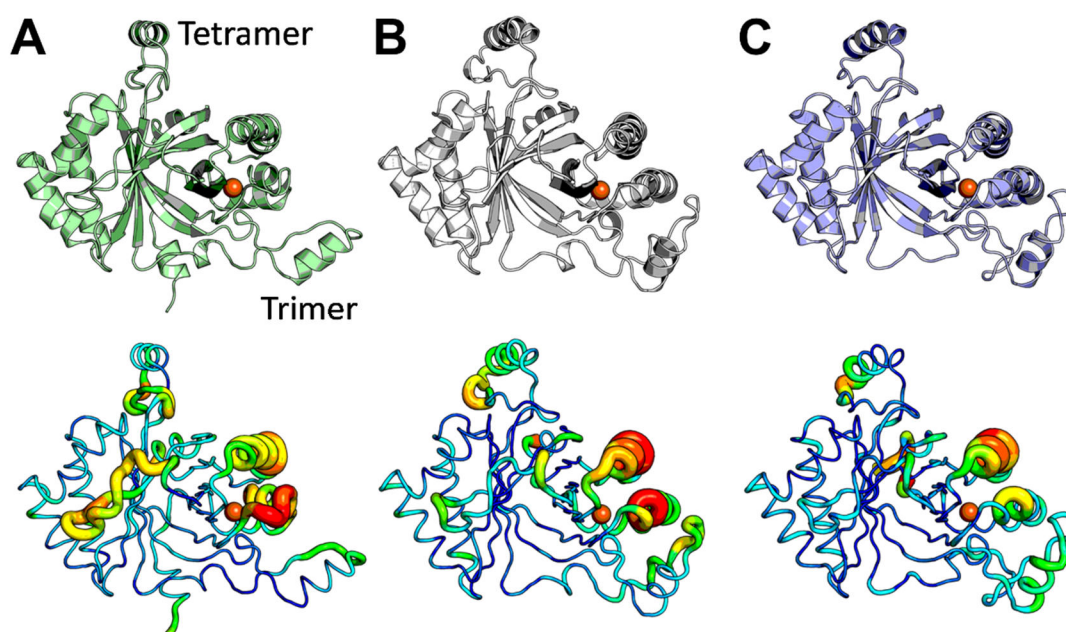
<sup>1</sup> Bezogen auf die Aminosäuresequenz ohne Strep-Tag.

<sup>2</sup> Bezogen auf das TpSOR-Monomer.

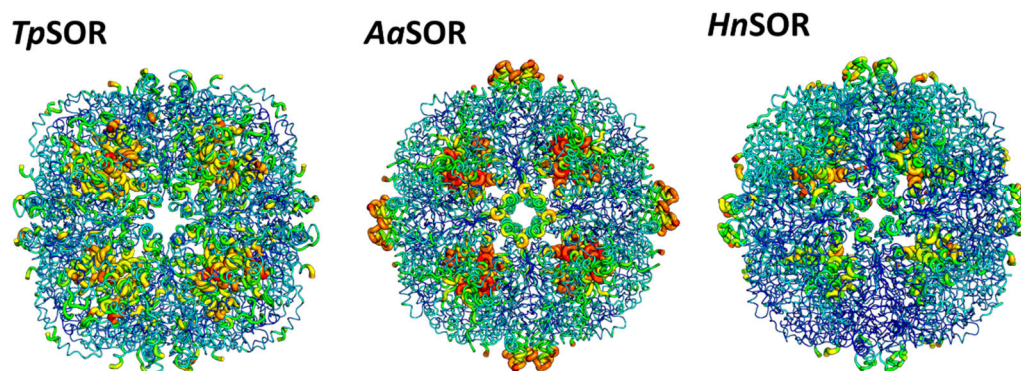
Nach *Refinement* und Optimierung der *TpSOR* Struktur wurde diese im Hinblick auf die Verteilung ihrer Kombination der Diederwinkel  $\varphi$  und  $\psi$  von Protein-*backbones* mittels eines Ramachandran-Plots (Abb. 5.6; Ramachandran *et al.*, 1963) validiert. Die Analyse ergab ein Vorkommen von 84,1 % der Aminosäuren in ihrer energetisch favorisierten Konformation, wobei sich 11,0 % in einer energetisch zulässigen Konformation befinden, bei 4,9 % Ausreißern. Es ist eine nicht favorisierte Bindung (von insgesamt 2 494) und 15 nicht favorisierter Bindungswinkel vorhanden (von insgesamt 3 378). Eine Auswertung der Sekundärstrukturelemente basierend auf den Röntgenkristallstrukturen ergab, dass die *TpSOR* mit 39,2 % einen vergleichbaren Anteil von  $\alpha$ -Helices mit der *AaSOR* besitzt (Tab. 5.2). Beide Enzyme besitzen demnach ein deutlich höheres Vorkommen von  $\alpha$ -Helices verglichen mit vorangegangenen Analysen der *HnSOR* (Veith, 2011, Pöll, 2016).

## 5.2 Vergleichende SOR Kristallstrukturanalyse

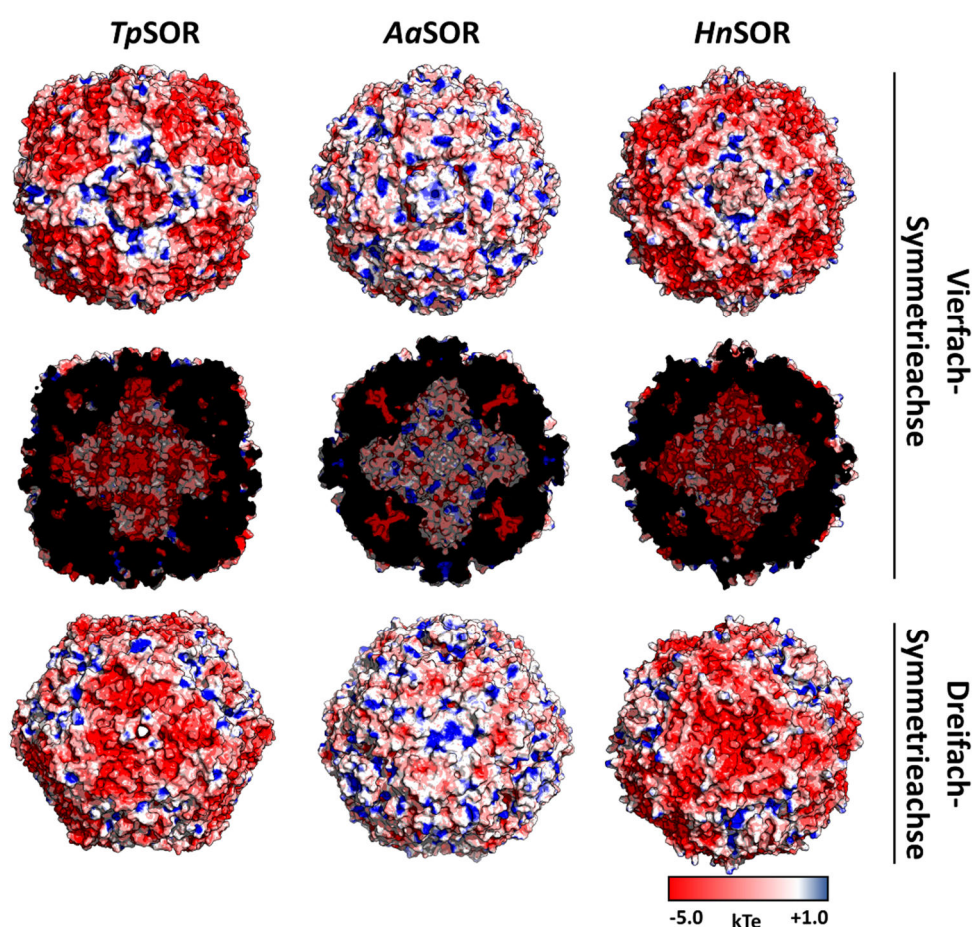
Überlagerungen der A-Untereinheiten von *TpSOR* mit der *AaSOR* ergeben eine quadratische Mittelabweichung (*root mean square deviation*; r.m.s.d.) von 1,07 Å (über 222 C $\alpha$ -Atome; Urich *et al.* (2004); PDB ID: 2CB2), mit der *HnSOR* von 0,90 Å (über 207 C $\alpha$ -Atome; Pöll (2017); PDB ID: 6QPA), was auf eine hohe strukturelle Ähnlichkeit der Strukturen hindeutet (Tab. 5.2). Dies wird ebenfalls deutlich, wenn man die Anordnung von Sekundärstrukturelementen und kristallographisch flexiblen Bereichen der drei SORs vergleicht (Abb. 5.8). Betrachtet man die atomaren Verschiebungsparameter (*atomic displacement parameters*, a.d.p.s) der drei SOR-Monomere und -Holoenzyme ist auffällig, dass sie ein vergleichbares Vorkommen von Bereichen mit kristallographisch hoher Flexibilität aufweisen (Abb. 5.8 und 5.9). Zudem besitzen alle drei SORs eine ähnlich stark ausgeprägte kristallographische Flexibilität von zwei  $\alpha$ -Helices, die einen Großteil des aktiven Zentrums



**Abbildung 5.8** | Vergleich der SOR-Monomere von *TpSOR* (A), *AaSOR* (B) und *HnSOR* (C). Obere Panels: SOR-Monomere in der Cartoon-Darstellung. Untere Panels: SOR-Monomere koloriert nach kristallographischer Flexibilität (*atomic displacement parameters*, a.d.p.s). Rote, dicke Bereiche deuten auf eine hohe Flexibilität, blaue, dünne Bereiche auf eine niedrige Flexibilität hin. Die Eisenatome sind als orangefarbene Kugel dargestellt.



**Abbildung 5.9** | Cartoon-Darstellung der SOR-Holoenzyme mit Kolorierung nach *atomic displacement parameters* (a.d.p.s). Bereiche mit hoher Flexibilität sind rot und dick dargestellt, während starre Bereiche blau und dünn erscheinen.

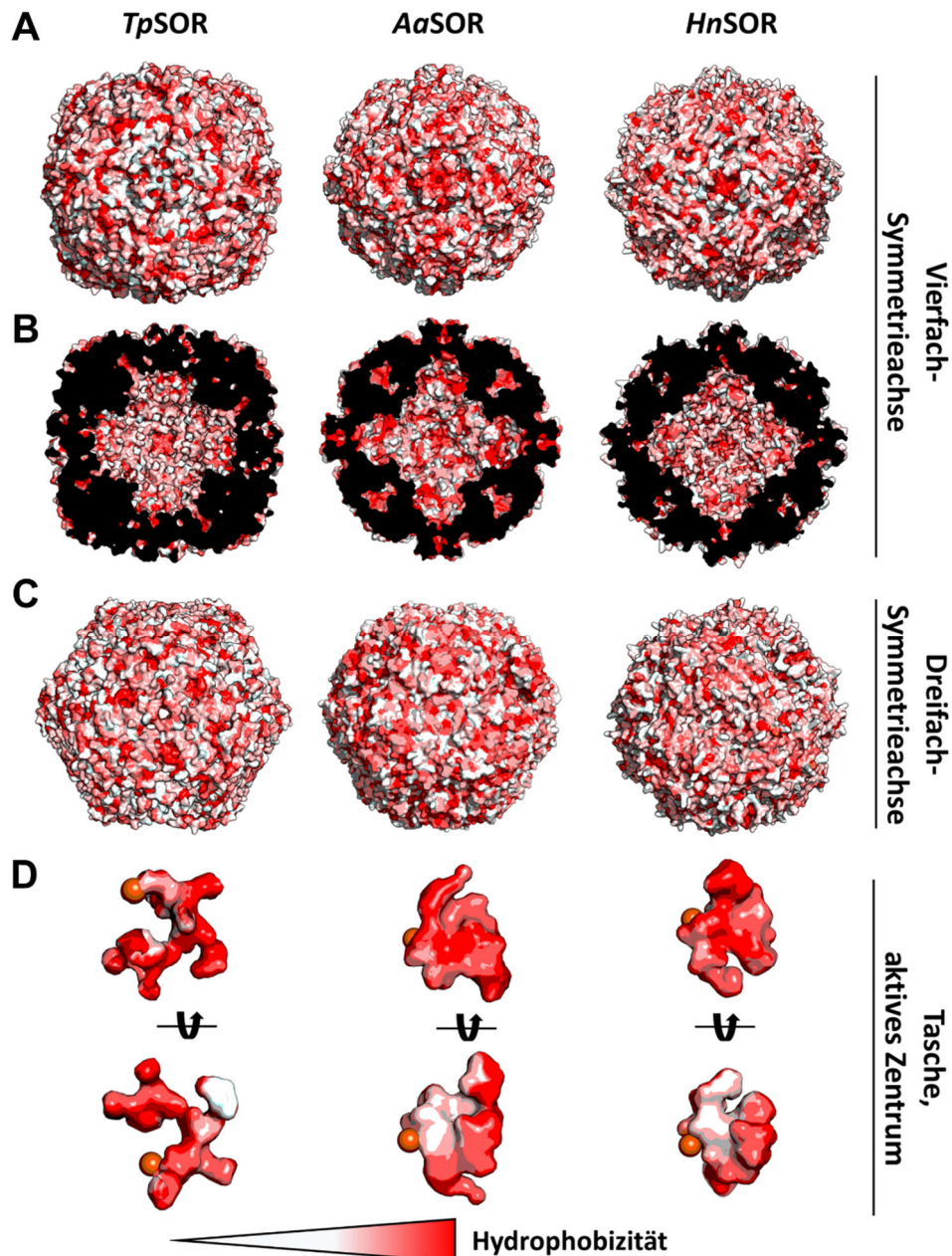


**Abbildung 5.10** | Elektrostatische Oberflächenpotentiale der SORs. Obere Panels, Aufsicht auf die Vierfachsymmetrieachse. Mittlere Panels, Einsicht in den inneren Hohlraum. Untere Panels, Aufsicht auf die Dreifachsymmetrieachse. Elektrostatische Potentiale in kTe; k, Boltzmann-Konstante; T, Temperatur der Kalkulation; e, Ladung eines Elektrons.

bilden und die *active site pocket* vom inneren Hohlraum abgrenzen. In der ersten Hälfte der  $\alpha$ -Helix 1 befindet sich dabei das essentielle C<sub>31/33/44</sub> (AaSOR-, HnSOR-, bzw. TpSOR-Nummerierung), in der zweiten Hälfte der

Helix 3 befinden sich die zwei weiteren konservierten, semi-essentiellen Cystein-Reste, wobei Helix 3 zusätzlich noch Tetramerkanal-bildende Reste beinhaltet (Helix-Nummerierung nach Kap. 4, Abb. 4.1). Außerdem





**Abbildung 5.11** | Hydrophobizitätsdarstellungen der SORs. **A**, Aufsicht auf die Vierfachsymmetrieachse. **B**, Einsicht in den inneren Hohlraum. **C**, Aufsicht auf die Dreifachsymmetrieachse. **D**, Bindungstasche des aktiven Zentrums mit Eisenatom. Hydrophobe Bereiche sind rot dargestellt, hydrophile weiß.

besitzen sowohl Bereiche des Tetramer- als auch des Trimerkanals vergleichsweise hohe a.d.p.s, was auf eine gewisse Notwendigkeit der Flexibilität der Öffnungen zur äußeren Oberfläche hindeuten könnte. In der *TpSOR* befindet sich zudem ein weiterer Bereich mit einer hohen kristallographischen Flexibilität in einer *loop*-Region an der äußeren Oberfläche, welcher vermutlich an der Untereinheit-

ten-Interaktion beteiligt ist. Die übrigen Teile der SOR-Strukturen weisen deutlich niedrigere gemittelte a.d.p.s auf und scheinen daher, zumindest kristallographisch, unflexibler zu sein.

Elektrostatische Messungen der Oberflächenpotentiale (*Electrostatic Surface Potential*, ESP) zeigen, dass negative Oberflächenladungen insbesondere bei den SORs aus mesophi-

len Organismen dominieren (Abb. 5.10). Lediglich in der Peripherie des Tetramerkans häufen sich positiv geladene Aminosäurereste. In der AaSOR besitzen dagegen der Trimerkanal und die innere Oberfläche des Tetramerkans eine positive Ladungsverteilung. Erstaunlicherweise ist vor allem der innere Hohlraum in der TpSOR und der HnSOR stark negativ geladen. Zwar weist die AaSOR im Gegensatz dazu teilweise positive Bereiche im Enzyminneren auf, jedoch steht dies im Widerspruch zu vorangegangenen ESP-Berechnungen der AaSOR, in denen eine überwiegend positive Ladungsverteilung im inneren Hohlraum kalkuliert worden war (Urich, 2005). Die positiven Ladungen am Trimerkanal der AaSOR beruhen auf den R<sub>99</sub>-Seitenketten und weiteren positiven Ladungen im Tunnelinneren. In der TpSOR ist der Trimerkanal dagegen weit geöffnet (C-C Abstände: 9,8 Å; AaSOR: 6,3 Å) und die positiven Ladungen sind nur in geringem Ausmaß am äußeren Ende vorhanden, während die HnSOR (Durchmesser 4,0 Å) eine gänzlich negative Ladungsverteilung in diesem Bereich aufweist.

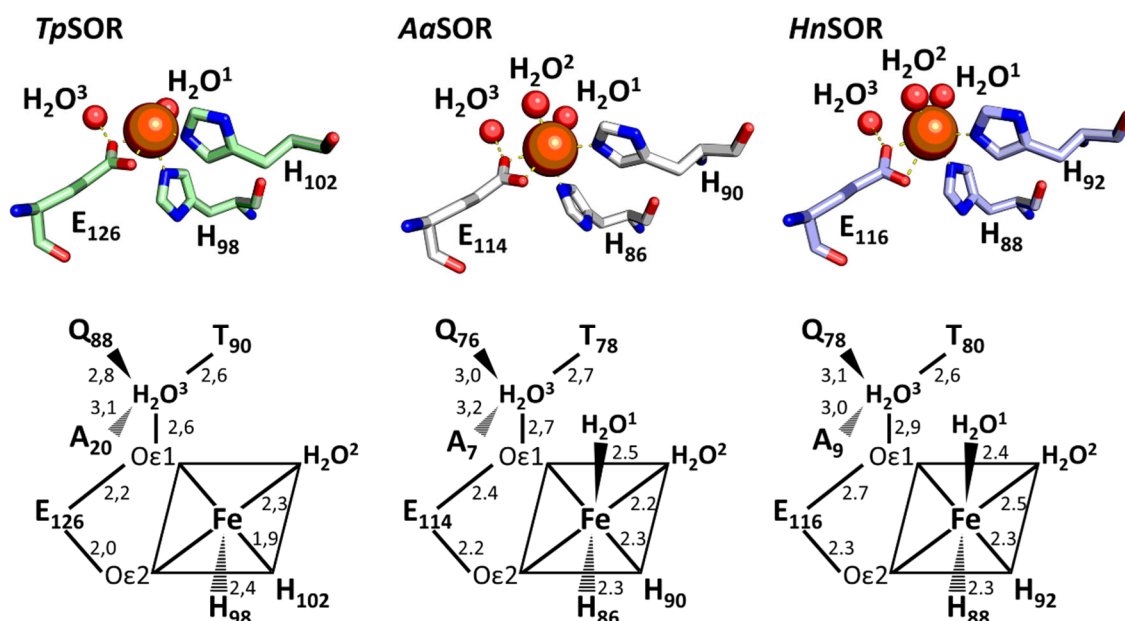
In AaSOR und HnSOR zeigt der Tetramerkans eine starke Hydrophobizität (Abb. 5.11), was aufgrund der Zusammensetzung des Kanals in der AaSOR (2 x Phe, Val, Met) und der HnSOR (Phe, Leu, Val, Met) nicht verwunderlich erscheint. Der Tetramerkans der TpSOR ist dagegen deutlich weniger hydrophob (Arg, Glu, Met), dafür jedoch signifikant kürzer (s. Kap. 6 für Details). Die positiven Ladungen aus ESP-Berechnungen der AaSOR resultieren demnach nicht direkt durch die Kanal-auskleidenden Aminosäurereste, sondern sind vielmehr die Folge von positiven Aminosäureresten in der Peripherie des Kanals (insbesondere K<sub>138</sub> und K<sub>139</sub>), deren elektrostatische Wechselwirkungen sich auf umliegende Reste des Tetramerkans auswirken. Im inneren Hohlraum der SORs sind dagegen hydrophobe Bereiche übermäßig gleichmäßig verteilt. Im Gegensatz dazu besitzt der Trimerkanal in AaSOR und HnSOR

einen hydrophilen Charakter, wohingegen er in der TpSOR hydrophober zu sein scheint, wenngleich der Durchmesser des Kanals im Vergleich zur AaSOR um 3,6 Å und zur HnSOR sogar um 5,8 Å deutlich erhöht ist.

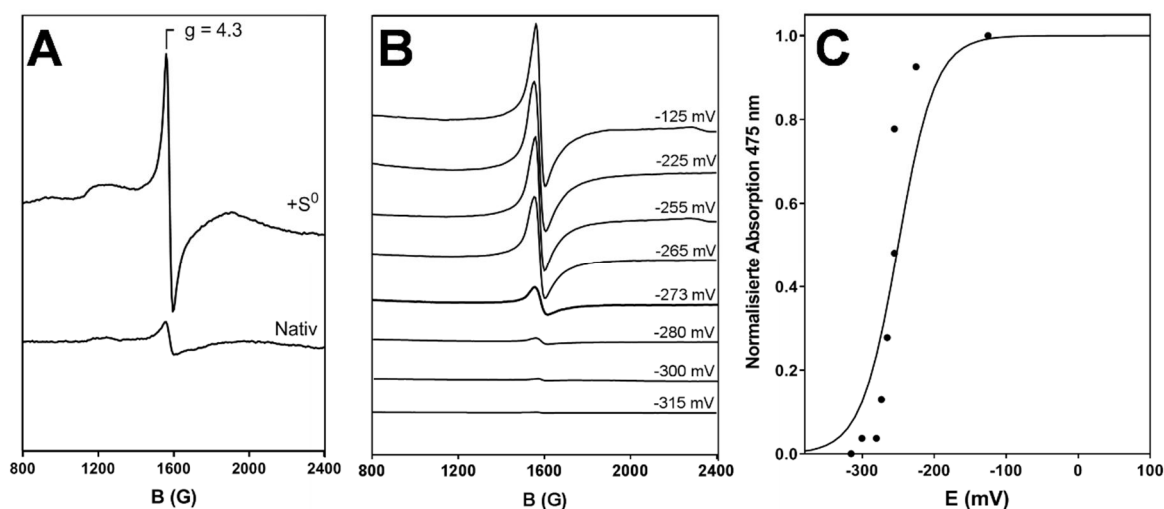
### 5.3 Das katalytische Zentrum

Die Bindungstasche des aktiven Zentrums besitzt ebenfalls eine stark ausgeprägte Hydrophobizität, lediglich im Bereich des katalytischen Eisenzentrums ist in der AaSOR und der HnSOR ein hydrophiles Milieu vorhanden, was den Umsatz des hydrophoben Schwefels in der Bindungstasche zu hydrophilen Reaktionsprodukten am Eisenzentrum wahrscheinlich macht. Die Basis der katalytischen Zentren bildet je ein farbloses, mononukleäres, nicht-Häm Eisenzentrum pro Untereinheit der TpSOR, ebenso wie in anderen SORs. Das Eisenatom ist in einer deformierten oktaedrischen Koordinationssphäre ligiert. Die Koordinationspartner bilden zwei Histidin-Reste (H<sub>98</sub> und H<sub>102</sub>) zusammen mit einem zweizähnigen Glutamat-Rest (E<sub>126</sub>) und zwei Wassermolekülen (Abb. 5.12). Das Motiv der Koordination des Eisenzentrums stellt dabei eine Variation der 2-His-1-Carboxylat Triade mit einem zweizähnigen Glutamat-Liganden dar (Kal & Que, 2017). Die Koordinationssphäre weist große Ähnlichkeiten zu den höher aufgelösten Röntgenkristallstrukturen der AaSOR und der HnSOR auf. Nichtsdestotrotz zeigt in der TpSOR-Röntgenkristallstruktur lediglich ein Wassermolekül (H<sub>2</sub>O<sup>1</sup>) eine direkte Eiseninteraktion, im Gegensatz zur AaSOR und HnSOR (Abb. 5.12). Ein ähnlicher Effekt war bereits in niedrig aufgelösten Kristallstrukturen der AtSOR (2,7 Å) und der HnSOR (2,9 Å) beobachtet worden (Li *et al.*, 2008, Veith, 2011) und steht damit wohl im direkten Zusammenhang mit der atomaren Auflösung der Kristallstruktur.

Ein weiteres Wassermolekül (H<sub>2</sub>O<sup>3</sup>) in der TpSOR ist in zu großer Entfernung zum Eisenatom um dessen Koordinationssphäre zu komplettieren (Abb. 5.12). Eine Analyse



**Abbildung 5.12** | Eisenkoordination im aktiven Zentrum von SORs. Obere Panels, Eisenkoordination in der Kristallstruktur. Untere Panels, Koordinationssphäre des Eisens mit durchschnittlichen atomaren Abständen, inklusive Teile der sekundären Koordinationssphäre.



**Abbildung 5.13** | EPR-Spektroskopie der *TpSOR*. **A**, EPR-Spektren der nativen *TpSOR* und nach Inkubation mit elementarem Schwefel. **B**, EPR-Spektren von Redox-titrations der *TpSOR*. **C**, Normalisierte Intensitäten bei g = 4,3 der EPR-Messungen, aufgetragen gegen das Reduktionspotential. Die Kurve entspricht einer Nernst-Gleichung für den Übergang eines Elektrons im mononukleären Eisenzentrum der *TpSOR*.

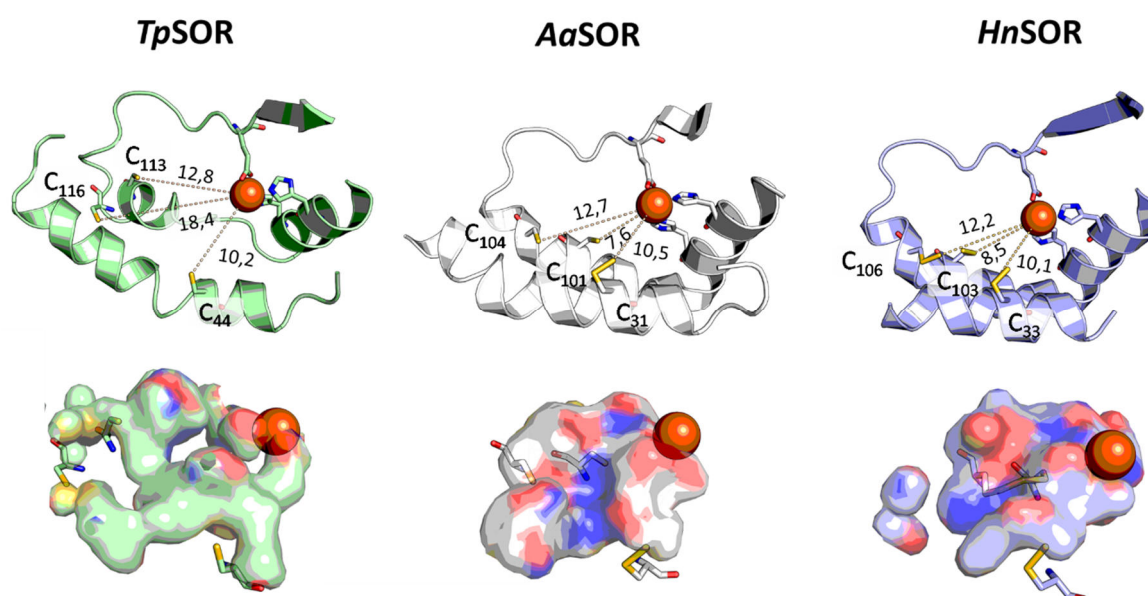
verfügbarer SOR-Strukturen ergab, dass dieses Wassermolekül in allen 3D-Strukturen konserviert ist. In der *TpSOR* wird es von dem O<sub>ε</sub>2-Atom der E<sub>126</sub>-Seitenkette, vom O<sub>γ</sub>1-Atom der T<sub>90</sub>-Seitenkette und vom Q<sub>88</sub> und A<sub>20</sub> backbone-Sauerstoff koordiniert, in *AaSOR* und *HnSOR* von den jeweiligen Homologen (Abb. 5.12). Elektronendichte für dieses Wasser-

molekül war in der *TpSOR* lediglich in einer Proteinuntereinheit der kristallographisch asymmetrischen Einheit vorhanden. In den anderen sieben Untereinheiten waren entweder gar kein Eisen-assoziiertes Wasser (viermal) oder lediglich eines sichtbar (dreimal). Die Identifizierung des zusätzlichen konservierten Wassermoleküls H<sub>2</sub>O<sup>3</sup> in unmit-

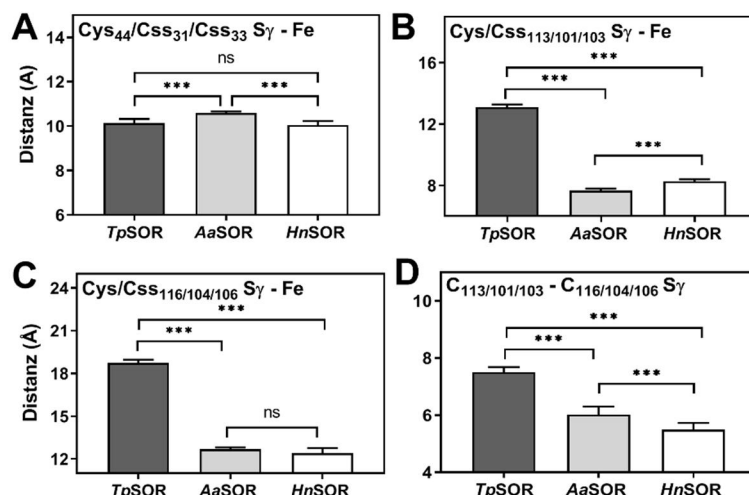
telbarer Nähe zum Eisenatom könnte jedoch ein Hinweis auf eine mechanistische Beteiligung während des Substratumsatzes sein.

EPR-Spektroskopie der *TpSOR* zeigte eine isotrope Resonanz bei  $g = 4,3$ , welche charakteristisch für ein mononukleäres *high-spin* Eisenatom mit dem Ladungszustand  $+3$  ist (Abb. 5.13 A). In der nativen *TpSOR* war das Signal nur geringfügig ausgeprägt, steigerte sich jedoch deutlich nach Inkubation mit elementarem Schwefel für 5 min bei 80 °C. Dies lässt auf eine Oxidation des Eisenzentrums während der Katalyse schließen und unterscheidet sich in diesem Punkt maßgeblich von der *AaSOR*, bei der die Inkubation mit elementarem Schwefel eine Reduktion des Eisenzentrums zur Folge hatte (Urich, 2005). EPR-gekoppelte Redox titrationen zeigten, dass das Eisenzentrum ein negatives Standard-Reduktionspotential mit einem  $E_0'$  von  $-251,7$  mV bei pH 8,5 besitzt (Abb. 5.13 BC) und sich damit in einem ähnlichen Bereich wie das Reduktionspotential der *AaSOR* befindet ( $-268$  mV bei pH 6,5; Urich (2005)).

Interessanterweise ist in der Röntgenkristallstruktur der *TpSOR* keine typische Substratbindungstasche in Strukturdarstellungsprogrammen ersichtlich. Das katalytische Eisenatom wird zwar von denselben Aminosäuren koordiniert, liegt jedoch am äußeren Ende eines schmalen Tunnelgeflechts (Abb. 5.14), welches in Strukturanalysen lediglich bei einem Lösungsmittellradius von  $1,0$  Å sichtbar war (der Standardradius beträgt  $1,4$  Å). Die einzelnen, (semi-)essentiellen Cystein-Reste sind dabei deutlich voneinander separiert und stehen in keinem direkten Kontakt zueinander. Das essentielle  $C_{44}$  ist nicht modifiziert wie in der *AaSOR* ( $C_{ss31}$ ) und *HnSOR* ( $C_{ss33}$ ). Ebenso bilden die Cysteine  $C_{113}$  und  $C_{116}$  keine Schwefelbrücken aus (wie in der *HnSOR*  $C_{103}$  und  $C_{106}$  in einigen Untereinheiten). Im Gegensatz zur *AaSOR*- und *HnSOR*-3D-Struktur befinden sich die beiden benachbarten Cysteine nicht in einem durchgängigen helikalen Sekundärstrukturelement. Vielmehr ist die  $\alpha$ -Helix 3 im Vergleich zu den anderen SORs deutlich verkürzt (vgl. Abb. 5.6), sodass  $C_{116}$



**Abbildung 5.14** | Darstellung der aktiven Zentren von SORs inklusive der katalytischen Eisenatome, der Eisenliganden und der konservierten Cysteine. Obere Panels, Cartoon-Darstellung der Bindungstasche mit Abständen der Cysteine zum Eisenzentrum (in Å). Untere Panels, Oberflächendarstellung der Bindungstasche. Anmerkung: Für die Oberflächendarstellung der *TpSOR*-Bindungstasche wurde der Lösungsmittellradius in PyMOL auf  $1,0$  Å herabgesetzt.



**Abbildung 5.15** | Atomare Abstände zwischen Schwefelatomen der Cysteine-Reste und dem katalytischen Eisenatom. **A**, Abstände zwischen C<sub>44</sub>/C<sub>31</sub>/C<sub>33</sub> S<sub>γ</sub> und dem Eisenatom. **B**, Abstände zwischen C<sub>113</sub>/C<sub>101</sub>/C<sub>103</sub> S<sub>γ</sub> und dem Eisenatom. **C**, Abstände zwischen C<sub>116</sub>/C<sub>104</sub>/C<sub>106</sub> S<sub>γ</sub> und dem Eisenatom. **D**, Abstände zwischen den distalen Schwefelatomen der konservierten Cysteine in Helix 3. Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung aus den Messungen aller Proteinuntereinheiten in der jeweiligen asymmetrischen Einheit. Die Signifikanz wurde mittels *t*-Test bestimmt, ns, nicht signifikant, \* signifikant =  $P < 0,05$ , \*\* hoch-signifikant =  $P < 0,01$ , \*\*\* extrem signifikant =  $P < 0,001$ .

in einem *coil/loop* Bereich lokalisiert ist, während sich C<sub>113</sub> weiterhin in der  $\alpha$ -Helix befindet. Es ist daher davon auszugehen, dass insbesondere C<sub>116</sub> eine vergleichsweise hohe Flexibilität aufweisen kann. Die Cysteine C<sub>113</sub> und C<sub>116</sub> besitzen in der TpSOR einen deutlich größeren Abstand zum katalytischen Eisenatom, verglichen mit den entsprechenden Abständen in AaSOR und HnSOR (Abb. 5.15). Demzufolge sind in der TpSOR die S<sub>γ</sub>-Abstände um ein Vielfaches höher als in den anderen beiden SORs, wobei der Abstand zum Eisenzentrum in der HnSOR im Vergleich zur AaSOR ebenfalls signifikant erhöht ist. Im Gegensatz dazu unterscheidet sich der S<sub>γ</sub>-Abstand von C<sub>104</sub> bzw. C<sub>106</sub> zum Eisen in der AaSOR und der HnSOR nicht signifikant voneinander. Betrachtet man die S-S-Abstände der beiden benachbarten Cysteine zueinander, wird ebenfalls ein größerer Abstand in der TpSOR sichtbar, wobei der S-S-Abstand in der AaSOR wiederum größer gegenüber der HnSOR ist (Abb. 5.15). Umgekehrt sind die Abstände von C<sub>44</sub> und C<sub>31</sub> zum Eisen in TpSOR und HnSOR nicht signifikant unterschiedlich, beide sind jedoch geringer als in der AaSOR.

## 5.4 Kryo-EM-Strukturen der AaSOR und der TpSOR

Kryo-EM-Strukturen der AaSOR und der TpSOR wurden mittels Einzelpartikel Kryo-Elektronenmikroskopie ermittelt um mögliche Modifikationen und Konformationen von Aminosäuren ohne Kristallisationsprozess nahe ihrer nativen Konformation identifizieren zu können.

Die Kryo-EM-Karte der aus *E. coli* gereinigten AaSOR wurde aus 45 005 Partikelbildern ermittelt und mit einer Auflösung von 2,5 Å *refined*. Die der ebenfalls aus *E. coli* gereinigten TpSOR wurde aus 47 378 Partikelbildern ermittelt. Das *Refinement* erfolgte bei einer Auflösung von 3,1 Å (Tab. 5.3). Für die Anpassung der Kryo-EM-Karten in *Phenix* wurden die jeweiligen Röntgenkristallstrukturen als Modell genutzt. Die Holoenzyme beinhalten insgesamt 7 344 bzw. 7 416 Aminosäurereste mit jeweils 24 Eisenatomen. Nach dem *Refinement* besaßen 98,0 % der Aminosäurereste der AaSOR in Ramachandran-Analysen ein Vorkommen in der energetisch favorisierten Position ohne Ausreißer, während in

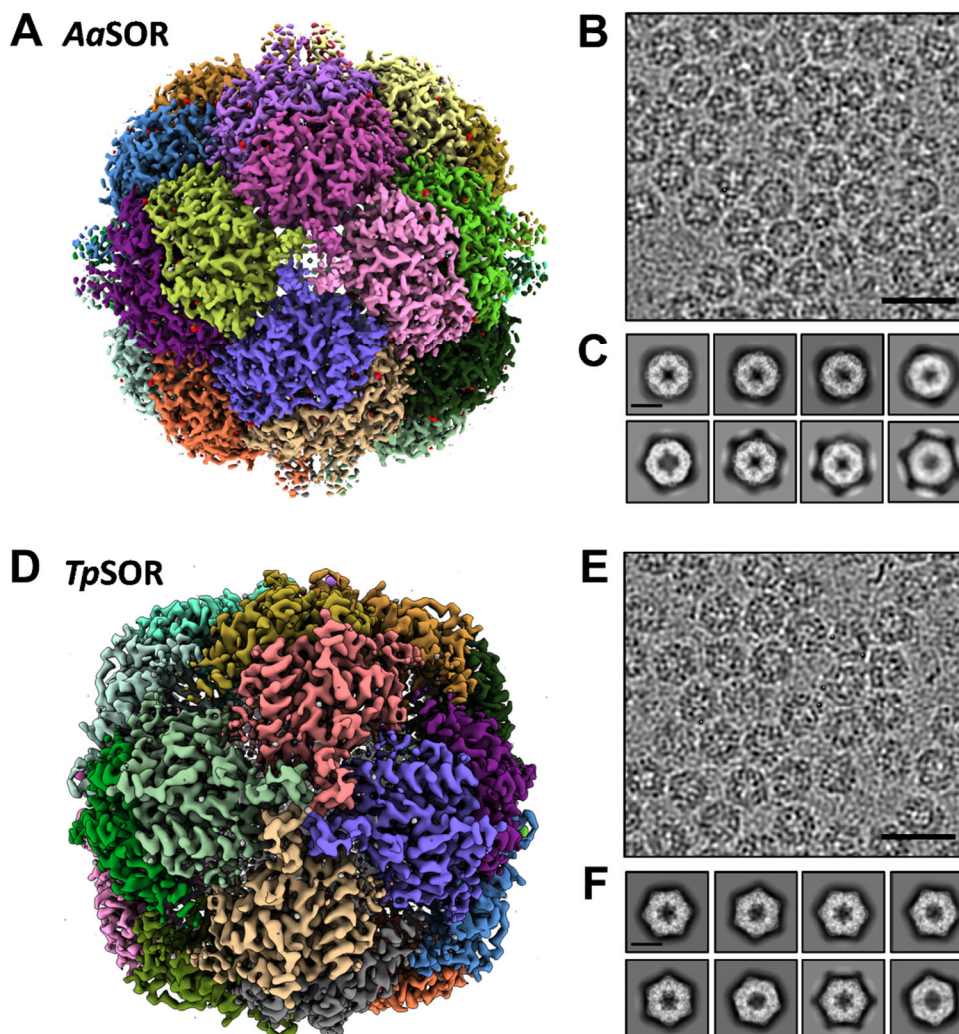


**Tabelle 5.3** | Datensammlung, *Refinement* und Modellierungsstatistiken der *AaSOR* und *TpSOR* Kryo-EM-Strukturen.

	<i>AaSOR</i>	<i>TpSOR</i>
<b>Datensammlung und Prozessierung</b>		
Elektronenmikroskop	Titan Krios	Titan Krios
Elektronendetektor	Falcon III	Falcon III
Vergrößerung	96 000	96 000
Spannung (kV)	300	300
Elektronenbelichtung (e <sup>-</sup> /Å <sup>2</sup> )	31	31
Unschärfebereich (µm)	0,9-2,1	0,6-2,1
Pixelgröße (Å)	0,827	0,827
Symmetrie (auferlegt)	T	T
Initiale Partikelbilder (#)	50 052	228 552
Finale Partikelbilder (#)	45 005	47 378
Auflösung der Karte (Å)	2,5	3,1
<i>B</i> Faktor der Kartenschärfung (Å <sup>2</sup> )	-67	-124
<b>Modellbildung und <i>Refinement</i></b>		
Initial genutzte Modelle (PDB ID)	2CB2	Röntgenkristallstruktur (Diese Arbeit)
Modellzusammensetzung		
Proteinuntereinheiten	24	24
Aminosäurereste	7344	7416
Liganden	24 (Fe)	24 (Fe)
r.m.s. Abweichungen (r.m.s.d.)		
Bindungslängen (Å)	0,00	0,01
Bindungswinkel (°)	0,89	1,15
Ramachandran Plot		
Favorisiert (%)	98,01	89,00
Ausreißer (%)	0,00	0,65
Validierung		
MolProbity Score	1,27 (100. Perzentille)	1,76 (100. Perzentille)
Clashscore	5,09 (99. Perzentille)	3,95 (100. Perzentille)
Schlechte Rotamere (%)	0,48	0,38

der *TpSOR* 89,0 % ein energetisch favorisiertes Vorkommen aufwiesen bei 0,7 % Ausreißern. Die Kryo-EM-Analysen bestätigen, dass beide SORs aus 24 identischen Untereinheiten mit einer hohen Symmetrie gebildet werden. Aufgrund der hohen Auflösung beider Strukturen sind die Elektronendichten klar abgegrenzt und die einzelnen Aminosäurereste in den meisten Bereichen eindeutig definierbar (Abb. 5.16 AD, Abb. 5.17 BD). Wie in vorangegangenen Studien, bei denen SORs negativ gefärbt und anschließend elektronenmikroskopisch abgebildet wurden (Urich *et al.*, 2004, Rühl *et al.*, 2017), sieht man in den nicht kontrastierten Bereichen der Aufnahmen typische runde Strukturen, welche das SOR-Holoenzym bilden und höchst-

wahrscheinlich die biologisch aktive Einheit des Enzyms darstellen (Abb. 5.16 BE). Einzelne zweidimensionale Querschnitte durch die rekonstruierten Kryo-EM-Karten aus den 2D Klassifizierungen zeigten das Vorkommen von hauptsächlich zwei verschiedenen Subpopulationen mit jeweiligen Aufsichten auf die Vierfach- und Dreifachsymmetrieachsen (Abb. 5.16 CF). Überlagerungen der Elektronendichtekarte mit der Kryo-EM-Struktur verdeutlichten für beide SORs, dass alle Sekundärstrukturelemente an Elektronendichten angepasst werden konnten (Abb. 5.17). Die Bestimmung der lokalen Auflösung beider Enzyme zeigte darüber hinaus, dass vor allem Bereiche am äußeren Ende des Tetramerkannels und in Ausstülpungen des inneren Hohl-

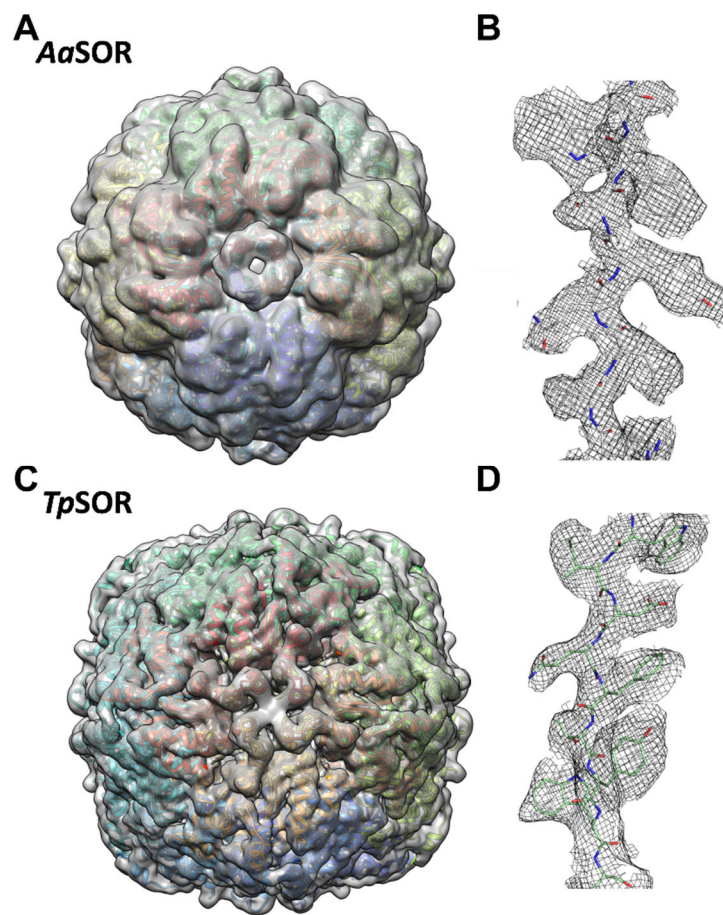


**Abbildung 5.16** | **A,D**, Kryo-EM-Elektronendichtekarten der *AaSOR* und *TpSOR* bei 2,5 Å bzw. 3,1 Å Auflösung mit kolorierten Enzymuntereinheiten. **B,E**, Repräsentative Kryo-EM-Elektronenmikroskopaufnahmen der SOR-Holoenzyme. Maßstabsbalken, 25 nm **C,F** 2D *Class Averages* der am häufigsten vorkommenden Einzelpartikelsymmetrien. Maßstabsbalken, 10 nm.

raums signifikant schlechter aufgelöst sind als die übrige Struktur (Abb. 5.18). Solche Bereiche sind passgenau zu jenen mit hohen a.d.p.s in den SOR-Röntgenkristallstrukturen.

Anhand von Vergleichen der *AaSOR* Röntgenkristallstruktur (Auflösung: 1,7 Å) mit der Kryo-EM Struktur (2,5 Å) wurden nur geringe Abweichungen in den Proteinuntereinheiten mit einer r.m.s.d. von 0,3 Å beobachtet. Die Eisenkoordinationssphäre besitzt, wie in niedrig auflösenden Röntgenkristallstrukturen von SORs, lediglich Elektronendichte für ein Wassermolekül ( $\text{H}_2\text{O}^1$ ). Leichte Abweichungen sind in der Ausrichtung des

$\text{H}_{90}$ - und  $\text{E}_{114}$ -Restes vorhanden. So verringert sich der Abstand der beiden  $\text{E}_{114}$ -Bindungsstellen zum Eisenatom auf jeweils 2,1 Å, und von  $\text{H}_{90}$  auf 2,2 Å (Abb. 5.19 B, Vgl. Abb. 5.12). Der Bindungswinkel des Glutamat-Restes vergrößert sich in der Kryo-EM Struktur auf 62,8° (im Vergleich zu 58,8° in der Röntgenkristallstruktur). Auch das koordinierende Wassermolekül besitzt in der Kryo-EM Struktur einen geringeren Bindungsabstand zum Eisenatom (2,1 Å gegenüber 2,5 Å). Ein deutlicher Unterschied ergibt sich in der Orientierung der beiden benachbarten, konservierten Cystein-Reste in der *AaSOR*. Diese

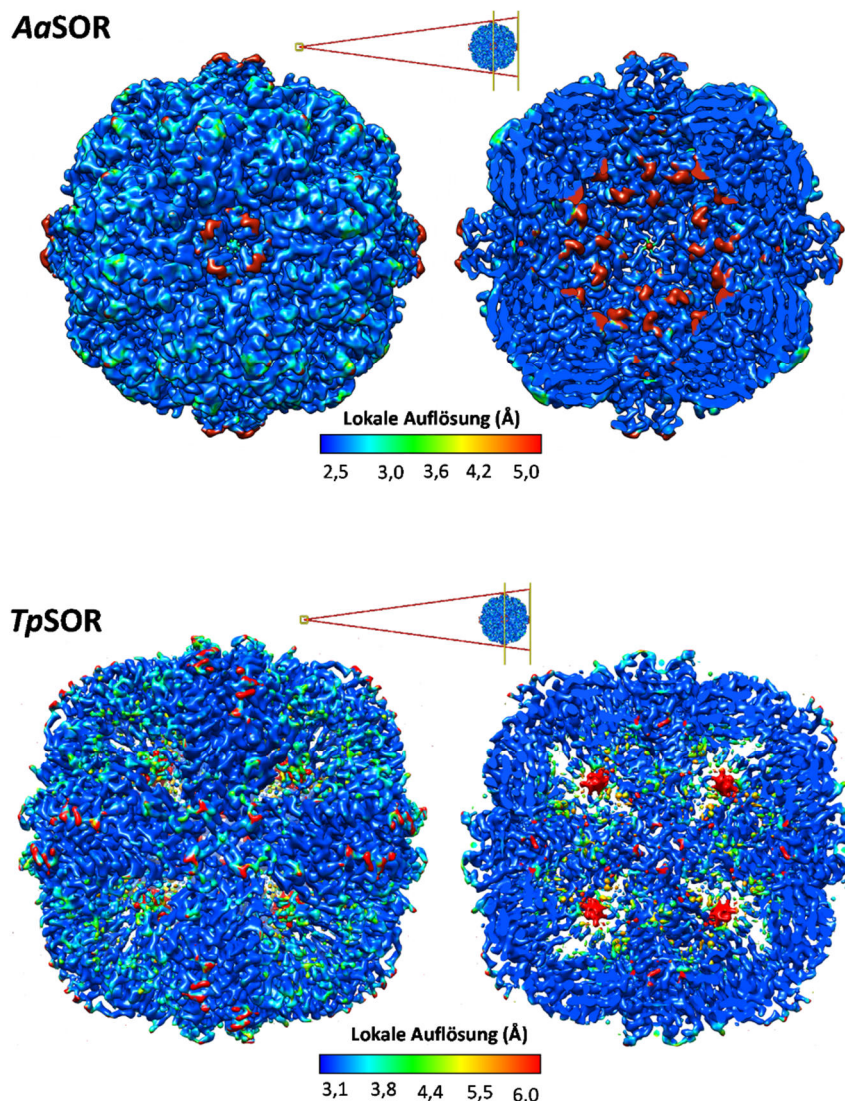


**Abbildung 5.17** | **A,C**, Kryo-EM Karten der *AaSOR* und der *TpSOR* mit angepassten Strukturelementen. **B,D**, Ausgewählte Regionen der jeweiligen SOR-Untereinheit mit modellierten Aminosäureresten und entsprechender Elektronendichte. Dargestellt ist für die *AaSOR* die Region zwischen den Aminosäureresten 73-81 und für die *TpSOR* zwischen den Resten 85-93.

sind in der Röntgenkristallstruktur nahezu parallel angeordnet. Die Schwefelatome in der Kryo-EM Struktur sind hingegen um  $137^\circ$  bzw.  $114^\circ$  rotiert und zeigen zueinander (Abb. 5.19). Der Abstand vom Sy-Atom zum katalytischen Eisenatom ändert sich für C<sub>104</sub> dabei nicht signifikant, während sich der Abstand bei C<sub>101</sub> von 7,6 auf 10,0 Å erhöht (Vgl. Abb. 5.15). Das essentielle *AaSOR*-C<sub>31</sub> besitzt, ebenso wie in der Röntgenkristallstruktur, eine zusätzliche Elektronendichte am Sy-Atom, was ebenfalls auf eine Persulfurierung schließen lässt. Die Orientierung der Seitenkette ändert sich dadurch jedoch nicht und auch der Abstand zum Eisenzentrum bleibt im Vergleich zur Röntgenkristallstruktur unverändert.

Vergleiche der Röntgenkristallstruktur der *TpSOR* (2,8 Å) mit der Kryo-EM Struktur (3,1 Å), zeigten mit r.m.s.d.-Werten von 0,51 Å größere Unterschiede verglichen mit den *AaSOR* Strukturen. Insbesondere waren hier von *loop*-Regionen in der Nähe der Tetramer- und Trimerkanäle betroffen. Zusätzlich gibt es leichte Abweichungen der bereits in der *TpSOR*-Röntgenkristallstruktur identifizierten, interhelikalen *loop*-Region des aktiven Zentrums (Abb. 5.19 DF). Der N-Terminus der Kryo-EM-Struktur weist, im Gegensatz zur Röntgenkristallstruktur, Elektronendichte für einen Asparagin-Rest (N<sub>2</sub>) auf, wohingegen der C-Terminus um eine Aminosäure verkürzt ist. Aufgrund der Auflösungsgrenze von 2,8 Å, konnten H<sub>2</sub>O-Moleküle in keine Elektronen-



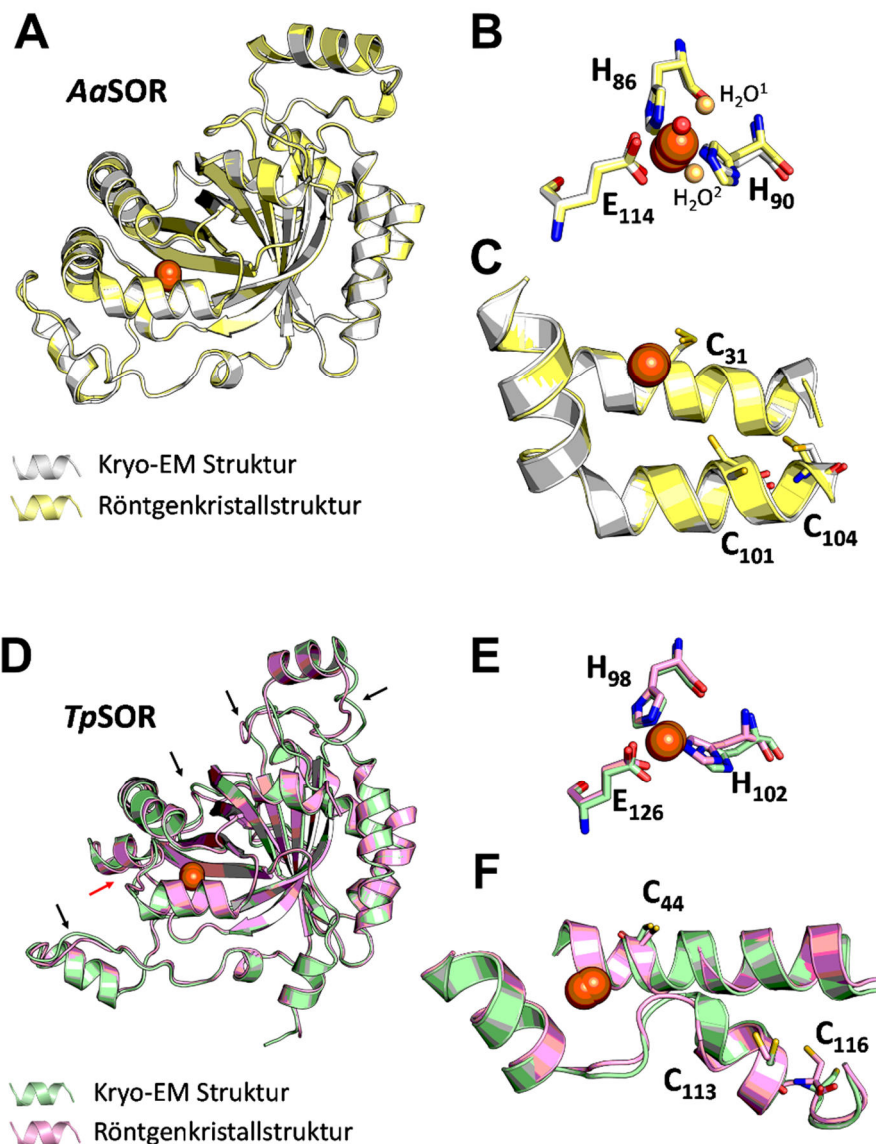


**Abbildung 5.18** | Darstellung der lokalen Auflösung der *AaSOR* und *TpSOR* Kryo-EM-Strukturen. Links ist jeweils die Aufsicht auf die Vierfachsymmetrieachse gezeigt, rechts die Schnittebene durch die Vierfachsymmetrieachse. Analysen erfolgten mittels ResMap (Kucukelbir *et al.*, 2014).

dichtekarte modelliert werden. Wie in der *AaSOR* sind auch in der *TpSOR* leichte Abweichungen der Eisenkoordination zwischen Kryo-EM- und Röntgenkristallstruktur vorhanden. Der zweizählige Glutamat-Rest ist um das C $\delta$ -Atom rotiert was in einer Verschiebung der Bindungsabstände zum Eisenatom resultiert. Während der Abstand von O $\epsilon_2$  unverändert bleibt, erhöht sich der Abstand des O $\epsilon_1$ -Atoms von 2,2 auf 2,6 Å (Abb. 5.19 E, Vgl. Abb. 5.12). Dies hat eine Verkleinerung des Bindungswinkels von 58,5° (Röntgenkristall-

struktur) auf 53,4° (Kryo-EM) zur Folge. Eine signifikante Erhöhung des Bindungsabstandes zeigt sich in der Eisenkoordination von H<sub>102</sub>, welcher von 1,9 Å (Röntgenkristallstruktur) auf 2,6 Å (Kryo-EM) steigt. Analog zu den Beobachtungen der *AaSOR* könnte dies ein Anzeichen für eine generelle Flexibilität der Eisenbindung von SORs sein.

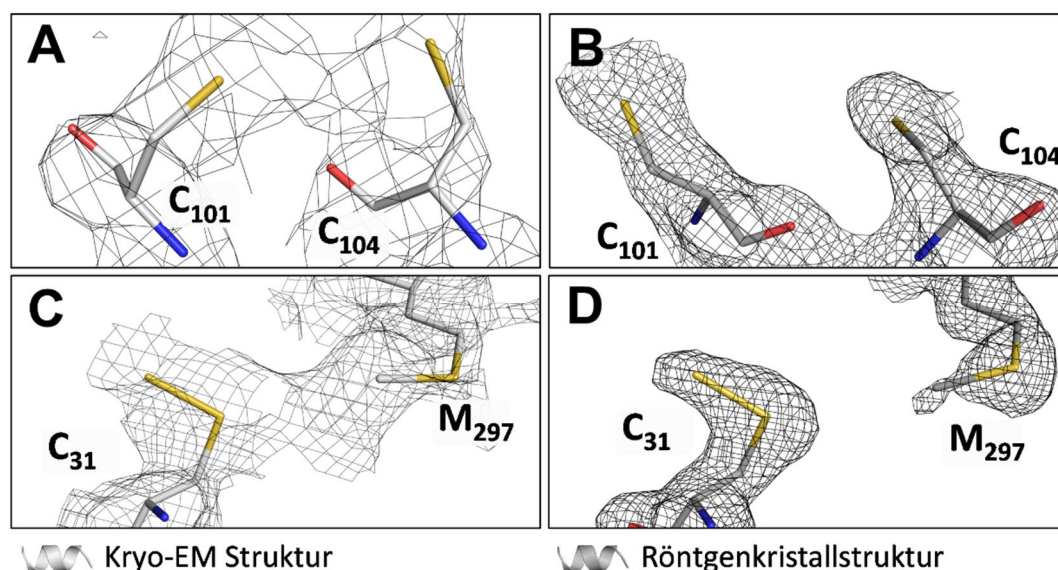
Sowohl in der *AaSOR* als auch in der *TpSOR* besaßen die konservierten Cysteine teilweise abweichende Orientierungen abhängig von der jeweiligen Untersuchungsme-



**Abbildung 5.19** | Vergleichende Röntgenkristall- und Kryo-EM-Strukturanalysen der *AaSOR* und der *TpSOR*. **A,D**, Vergleiche der A-Untereinheiten. Schwarze Pfeile, Unterschiede zwischen Röntgenkristallstruktur und Kryo-EM-Struktur; Roter Pfeil, Abweichung in der Substratbindungstasche (aktives Zentrum). **B,E**, Vergleiche der Eisenkoordination. **C,F**, Vergleiche der Bindungstasche-bildenden Helices mit konservierten Cystein-Res-ten.

thode: Zusätzliche Elektronendichte am Sy-Atom des essentiellen C<sub>44</sub>, die auf eine Persulfurierung des Restes hindeuten würde, wurde ebenso wenig in der *TpSOR*-Kryo-EM- wie in der -Röntgenkristallstruktur gefunden. Der Abstand zum katalytischen Eisenatom ist um 0,6 Å vergrößert. Die beiden benachbarten, konservierten Cysteine weisen eine gänzlich abweichende Orientierung auf, analog zur *AaSOR*. C<sub>113</sub> ist in der Kryo-EM-Struktur eben-

falls dem Eisenatom abgewandt mit einem Abstand von 14,8 Å (Röntgenkristallstruktur 12,8 Å), was aus einer Rotation um 56,9° um das Cβ-Atom resultiert. C<sub>116</sub> ist in der Kryo-EM-Struktur um 92,7° rotiert, sodass sich in der Folge der Abstand zum aktiven Zentrum um 3,7 Å erhöht und beide Schwefelatome dem katalytischen Eisenatom abgewandt sind. Wie bereits in der Röntgenkristallstruktur beobachtet, befindet sich C<sub>113</sub> in einem he-



**Abbildung 5.20** | Vergleiche der Elektronendichte von konservierten Cystein-Resten zwischen AaSOR-Kryo-EM-Struktur und AaSOR-Röntgenkristallstruktur. **A**, Elektronendichte der Kryo-EM-Karten zwischen C<sub>101</sub> und C<sub>104</sub>. **B**, Elektronendichte von C<sub>101</sub> und C<sub>104</sub> der Röntgenkristallstruktur. **C**, Elektronendichte der Kryo-EM-Karten zwischen C<sub>31</sub> und M<sub>297</sub>. **D**, Elektronendichte von C<sub>31</sub> und M<sub>297</sub> der Röntgenkristallstruktur.

likalen Bereich, wohingegen C<sub>116</sub> in einem *loop* lokalisiert ist. Die Ausrichtung der *TpSOR*-Cysteine scheint somit kein Kristallisationsartefakt zu sein. Vielmehr weist Helix 3 eine Unterbrechung von sieben Aminosäuren (Aminosäuremotiv: <sub>104</sub>TFEDVVV<sub>110</sub>) in unmittelbarer Nähe zum Eisenatom auf, was die Flexibilität der Helix erhöht und die *TpSOR* von anderen SORs maßgeblich unterscheidet.

Überraschenderweise besitzen die beiden Cystein-Reste in der AaSOR-Kryo-EM-Struktur zusätzliche, in den Röntgenkristallstrukturen nicht vorhandene, Elektronendichten (Abb. 5.20). Ebenso sind die beiden benachbarten C<sub>101</sub> und C<sub>104</sub> im Vergleich zur Röntgenkristallstruktur, ähnlich wie in der *TpSOR*, um das C $\beta$ -Atom rotiert und zeigen zueinander. Die deutlichen Unterschiede der Winkel der Cystein-Seitenketten zwischen Röntgenkristall- und Kryo-EM-Struktur, sowohl in der *TpSOR* als auch in der AaSOR, deuten auf eine hohe Beweglichkeit in dem Bereich der Enzyme hin. Darüber hinaus wiesen sie eine durchgängige Elektronendichte zwischen ihren beiden distalen Schwefelatomen auf, wohingegen die Elektronendichte in

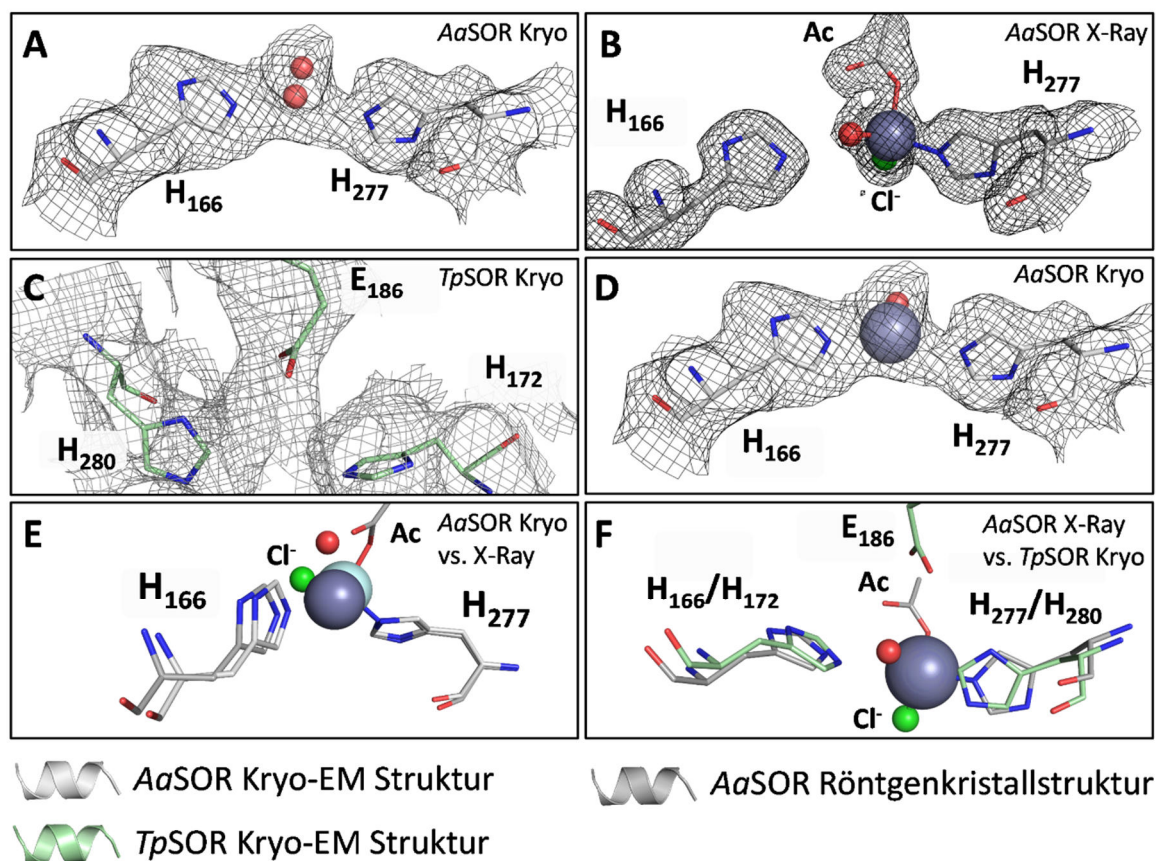
der Röntgenkristallstruktur klar separiert war (Abb. 5.20 AB). Dies könnte für die Ausbildung von Tri- oder Tetrasulfidbrücken zwischen den beiden konservierten Resten sprechen, wie sie bereits in ersten Strukturanalysen der *HnSOR*-Röntgenkristallstruktur beobachtet worden waren (Pöll, 2016). Zusätzlich war ein ähnlicher Effekt in der AaSOR Kryo-EM-Struktur zwischen dem persulfurierten C<sub>31</sub> und dem Eingangsporenbildenden M<sub>297</sub> sichtbar. Zwischen dem S $\gamma$  von C<sub>31</sub> und dem distalen C $\epsilon$ -Atom ist ebenfalls eine durchgängige Elektronendichte vorhanden (Abb. 5.20 C). Die Position des M<sub>297</sub> ist dabei im Vergleich zur Röntgenkristallstruktur nicht grundlegend verändert, wobei beide Reste hier eine klar abgegrenzte Elektronendichte besitzen (Abb. 5.20 D).

Eine weitere Besonderheit in der Kryo-EM-Struktur zeigte sich an den beiden Histidinen H<sub>166</sub> und H<sub>277</sub>. Beide liegen in einer Tasche, die vom aktiven Zentrum durch C<sub>31</sub> und M<sub>297</sub> separiert ist und waren in einer mit Zink inkubierten Röntgenkristallstruktur der AaSOR, zusammen mit einem Chlorid-Ion und einem Acetat, als Zink-Bindestelle identifiziert wor-



den (Veith *et al.*, 2011). In der Kryo-EM-Struktur der nativen AaSOR ist zwischen den beiden Aminosäureresten eine durchgängige Elektronendichte vorhanden, was auf eine Wasser- oder Metallbindung schließen lässt (Abb. 5.21). Die native Röntgenkristallstruktur der AaSOR zeigte dagegen keine Elektronendichte zwischen den beiden Histidin-Resten. Lediglich in Untereinheit C ist Elektronendichte für ein Wassermolekül in Wasserstoffbrückendistanz zu den beiden Histidin-Resten vorhanden. In der nativen Röntgenkristallstruktur der HnSOR ist dagegen in 23 der 24 Untereinheiten Elektronendichte für

ein Wassermolekül in unmittelbarer Nähe zu den homologen Resten H<sub>165</sub> und H<sub>282</sub> sichtbar. Ähnliches gilt für die TpSOR-Röntgenkristallstruktur: Auch hier ist in jeder der acht Untereinheiten Elektronendichte zwischen den Homologen H<sub>172</sub> und H<sub>280</sub> und E<sub>186</sub> vorhanden, wobei diese in zwei der Untereinheiten als Wassermolekül interpretiert und modelliert wurden. In den restlichen sechs Proteinuntereinheiten schien die Elektronendichte dagegen zu groß für die Bindung eines Wassermoleküls zu sein. Die Kryo-EM-Struktur der TpSOR wies ebenfalls eine durchgängige Elektronendichte zwischen den Homologen



**Abbildung 5.21** | Vergleiche der Elektronendichten der Zink-bindenden Aminosäuren der AaSOR- und TpSOR-Kryo-EM-Strukturen und der AaSOR Röntgenkristallstruktur. **A**, Elektronendichte der Reste H<sub>166</sub> und H<sub>277</sub> der AaSOR Kryo-EM-Struktur mit zwei in COOT modellierten Wassermolekülen (rot). **B**, Elektronendichte von H<sub>166</sub> und H<sub>277</sub> mit Zink (grau) und Chlorid (grün) aus der Zink-inhibierten AaSOR-Röntgenkristallstruktur (PDB ID: 2YAV). **C**, Elektronendichte der TpSOR-Reste H<sub>172</sub>, E<sub>186</sub> und H<sub>280</sub> bei 3,1 Å Auflösung. **D**, AaSOR-Kryo-EM-Struktur mit in COOT modellierten Zink-Atom. **E**, Strukturvergleich der Kryo-EM-Struktur mit modellierten Zink-Atom (COOT) mit der Zink-inhibierten AaSOR-Röntgenkristallstruktur. **F**, Strukturvergleich der Zink-inhibierten AaSOR-Röntgenkristallstruktur mit der TpSOR-Kryo-EM-Struktur. Abkürzungen: X-Ray, Röntgenkristallstruktur; Kryo, Kryo-EM-Struktur.



H<sub>172</sub> und H<sub>280</sub> auf. Da die Kryo-EM-Struktur der *Tp*SOR eine Auflösung von 3,1 Å besitzt sind Elektronendichten für Wassermoleküle nicht sichtbar, weshalb es sich hierbei höchstwahrscheinlich um die Bindung eines Atoms oder Moleküls mit einer höheren Elektronendichte handelt. Damit liegt die Hypothese nahe, dass in der *Aa*SOR Kryo-EM-Struktur ebenfalls eine Metallionenbindung zugrunde liegt (Abb. 5.21 D). Überlagerungen der Zink-inhibierten Röntgenkristallstruktur der *Aa*SOR mit der Zink-modellierten Kryo-EM-Struktur zeigen ähnliche Ligandenumfelder der Metallionen (Abb. 5.21 E). Auch Vergleiche mit einer Zink-modellierten Kryo-EM-Struktur der *Tp*SOR mit der Zink-inhibierten *Aa*SOR Röntgenkristallstruktur weisen eine

vergleichbare Koordination des Metalls auf, wobei in der *Tp*SOR die Bindungsstelle des Acetats von E<sub>186</sub> eingenommen werden könnte. Auch wenn die Kryo-EM-Strukturen Hinweise auf ein zweites Metallbindungszentrum in SORs liefern, bleibt ungeklärt, um welches Metall es sich bei der Bindung handeln könnte und warum keine entsprechende Elektronendichte in den hochauflösenden nativen Röntgenkristallstrukturen der *Aa*SOR sichtbar ist. Mögliche Erklärungen könnten jedoch schwache Metallkoordinationen oder artifizielle Metallbindungen sein, wobei weitere strukturelle und biochemische Untersuchungen nötig sind um diese Hypothesen im Detail aufzuklären.

## Diskussion

Erste SOR-3D-Strukturen wurden von den thermoacidophilen Archaea *Ac. ambivalens* und *Ac. tengchongensis* aufgeklärt, lange bevor SORs in mesophilen Bakterien identifiziert worden waren (Urich *et al.*, 2006, Li *et al.*, 2008). Mit der *HnSOR* wurde erst einige Zeit später die Kristallstruktur aus einem mesophilen Organismus veröffentlicht (Veith, 2011, Pöll, 2016). Alle Mitglieder der SOR-Proteinfamilie zeigen eine generelle Konservierung der Gesamtstruktur. Sie bilden aus 24 Untereinheiten aufgebaute Hohlkugeln mit einer 432-Punktsymmetrie. Die aktiven Zentren werden von nicht-Häm Eisenatomen in einer oktaedrischen Koordinationssphäre gebildet.

Trotz geringer Sequenzidentität von lediglich 29-34 % verglichen mit anderen SORs und einer tiefen Abzweigung im phylogenetischen Proteinstammbaum besitzt auch die SOR aus *Tv. paradoxus* eine ähnliche Gesamtarchitektur des SOR-Holoenzym. Erste Hinweise ergaben sich bereits aufgrund elektronenmikroskopischer Aufnahmen mit Negativkontrastierung vor der Strukturaufklärung (Rühl *et al.*, 2017). Messungen der Proteindurchmesser, ausgehend von den Elektronenmikroskopaufnahmen, zeigten einen etwas kleineren Proteindurchmesser der *TpSOR* verglichen mit der *AaSOR* (14,7 nm vs. 15,4 nm) (Rühl, 2015, Rühl *et al.*, 2017). In der Röntgenkristallstruktur erscheint die *TpSOR* durch Umlagerungen der verlängerten N-Termini zwischen die Ausstülpungen an der Vierfachsymmetrieachse zwar voluminöser, jedoch bestätigten Vermessungen der 3D-Struktur ein um ca. 1 nm kleineres *TpSOR*-Holoenzym verglichen mit der *AaSOR* (Durchmesser ausgehend von der jeweiligen 3D-Struktur 14,1 nm gegenüber 15,2 Å). Ursächlich hierfür ist hauptsächlich der in der *TpSOR* verkürzte Tetramerkanal.

Im Gegensatz zur *AaSOR*, in der sich die asymmetrische Einheit (AU) aus sechs Protein-Monomeren zusammensetzt, besitzt die *TpSOR* insgesamt acht AU-bildende Monomere, die *HnSOR* sogar 24 (Urich *et al.*, 2005a, Veith, 2011, Pöll, 2016). Dagegen weist die Elementarzelle der *TpSOR* die mit Abstand größten Dimensionen auf, sodass sich insgesamt acht Holoenzyme in ihr befinden (*AaSOR*: 2; *HnSOR*: 4). Holoenzyme aller SORs bilden Icosatetraeder, welche vermutlich eine der Hauptgründe für die hohe Thermostabilität von Vertretern der SOR-Proteinfamilie ist (s. Kap. 5 für Details). Ein zweiter Hauptgrund sind die zentralen  $\beta$ -barrels der Untereinheiten, die eine relativ starre Grundstruktur bilden.

Die Verteilung kristallographisch flexibler Regionen ist in allen SOR-Proteinen vergleichbar. Die Untereinheiten bilden auf wenige  $\alpha$ -Helices und wenige coils begrenzte flexible Bereiche im Enzyminneren, die teilweise auch direkt an der Struktur der *active site pocket* beteiligt sind (s. Abb. 5.8 und 5.9). *AaSOR* und *HnSOR* verfügen zusätzlich über bewegliche Bereiche an äußeren Ausstülpungen der Vierfachsymmetrieachse, die aufgrund eines verkürzten Tetramerkans in der *TpSOR* nicht vorhanden sind. *HnSOR* und *TpSOR* weisen im Vergleich zur *AaSOR* vermehrt negative Oberflächenladungen auf, sowohl auf der inneren, als auch der äußeren Enzymoberfläche. Zwar scheinen die Oberflächenpotentiale der *AaSOR* deutlich weniger negativ ausgeprägt zu sein als in den SORs aus Mesophilen, jedoch wiesen sie mit hier verwendeten Berechnungsmethoden kein signifikant erhöhtes Vorkommen positiver Ladungsträger auf der inneren Enzymoberfläche auf, wie es zunächst kalkuliert worden war (Urich, 2005). Die unterschiedlichen Resultate der elektrostatischen Oberflächenpotenti-

ale könnten auf die verschiedenen Berechnungsmethoden zurückzuführen sein, obwohl vergleichbare Eingangsparameter verwendet wurden. Vorangegangene Berechnungen nutzten den MEAD-Algorithmus (Bashford, 1997), während in dieser Arbeit der *Adaptive Poisson-Boltzmann Solver* verwendet wurde (Baker *et al.*, 2001). Letzterer stellt jedoch die zurzeit gängigere Methode zur Berechnung der Oberflächenpotentiale dar (basierend auf den Zitierwerten der jeweiligen Literatur; 315 vs. 6 012, Stand 12|19). Neben einer ausgeglichenen Ladungsverteilung ist kein vermehrtes Vorkommen hydrophober Aminosäurereste auf der inneren Enzymoberfläche vorhanden, weshalb der innere Hohlraum als Speicher hydrophober Schwefelverbindungen physiologisch als unwahrscheinlich einzustufen ist. Dennoch scheinen einige Poren und Tunnel physiologisch sinnvolle Substrateintritts- bzw. Produktaustrittspunkte darzustellen, sodass hydrophober Schwefel über den inneren Hohlraum zum aktiven Zentrum gelangen kann und hydrophile Reaktionsprodukte anschließend das Enzym verlassen können (s. Kap. 6 für Details).

### Redox-Eigenschaften des katalytischen *Tp*SOR nicht-Häm Eisenatoms

Zentrum der Katalyse bildet in SORs ein farbloses, mononukleäres nicht-Häm Eisenatom, dessen Redox-Potential für die *Aa*SOR mit -268 mV bei pH 6,5 bestimmt wurde und nach Inkubation mit elementarem Schwefel bei 80 °C irreversibel reduziert worden war (Urich, 2005). Das Eisenzentrum der *Tp*SOR besitzt mit -252 mV bei pH 8,5 ein ähnlich niedriges Reduktionspotential, zeigte jedoch abweichende Redox-Eigenschaften: Das *high-spin* Eisenatom besaß in seiner nativen Form hauptsächlich gepaarte Elektronen (vermutlich  $\text{Fe}^{2+}$ ) was in geringen Signalstärken in EPR-Messungen resultierte. Die Inkubation mit Schwefel hatte eine Oxidation des Eisens zur Folge, was auf einen grundlegend abweichenden Katalyseschritt in der *Tp*SOR verglichen mit der *Aa*SOR hindeuten könnte.

Wie in allen SORs wird auch in der *Tp*SOR das Eisenatom von zwei Histidinen und einem zweizähligen Glutamat koordiniert. Zwei Wassermoleküle komplettieren normalerweise die Koordinationssphäre. In der 3D-Struktur der *Tp*SOR (Auflösung 2,84 Å) ist in keiner Proteinuntereinheit Elektronendichte für ein zweites Eisen-koordinierendes Wassermolekül sichtbar. Die Eisenkoordination mit lediglich einem Wassermolekül war bereits für andere SOR-Strukturen mit Auflösungen von 2,6 Å oder schlechter beobachtet und als Artefakt der geringen atomaren Auflösung beschrieben worden (Li *et al.*, 2008, Veith, 2011). Allerdings könnte dieser Umstand auch so interpretiert werden, dass das Eisenatom im Oxidationszustand +II vorliegt, da  $\text{Fe}^{2+}$ -Zustände in nicht-Häm Oxygenasen häufig eine fünffache – und keine sechsfache – Koordinationssphäre besitzen (Koehntop *et al.*, 2005). Aufgrund der geringen atomaren Auflösung bleibt dies vorerst spekulativ.

Interessanterweise wurde in einer Proteinuntereinheit der *Tp*SOR ein zusätzliches Wassermolekül identifiziert, welches sich in zu großer Entfernung für eine direkte Eiseninteraktion befindet. Das Wassermolekül ( $\text{H}_2\text{O}^3$ ) wird von den *backbones* von Alanin und Glutamin, sowie der Threonin-Seitenkette und dem O $\epsilon$  aus Glutamat, welches gleichzeitig an der Eisenbindung beteiligt ist, koordiniert. Bei der Analyse der verfügbaren SOR-Strukturen wurde deutlich, dass dieses Wassermolekül, zusammen mit seinen Aminosäureliganden, in allen SOR-Strukturen konserviert ist. Die in der *Aa*SOR an der Koordination beteiligten Aminosäuren Q<sub>76</sub> und T<sub>78</sub> waren, aufgrund ihrer direkten Beteiligung an der Bindungstasche und der räumlichen Nähe zum katalytischen Zentrum, bereits Bestandteil zahlreicher Mutagenesestudien (u.a. Seyfarth, 2006, Veith, 2011, Becker, 2016). In der *Aa*SOR resultierten Substitutionen von Q<sub>76</sub> mit Alanin, Cystein oder Asparagin zwar in ca. 80 % verringerten Enzymaktivitäten, jedoch steht dies höchstwahrscheinlich nicht im Zusammenhang mit der Koordination des Wassermole-

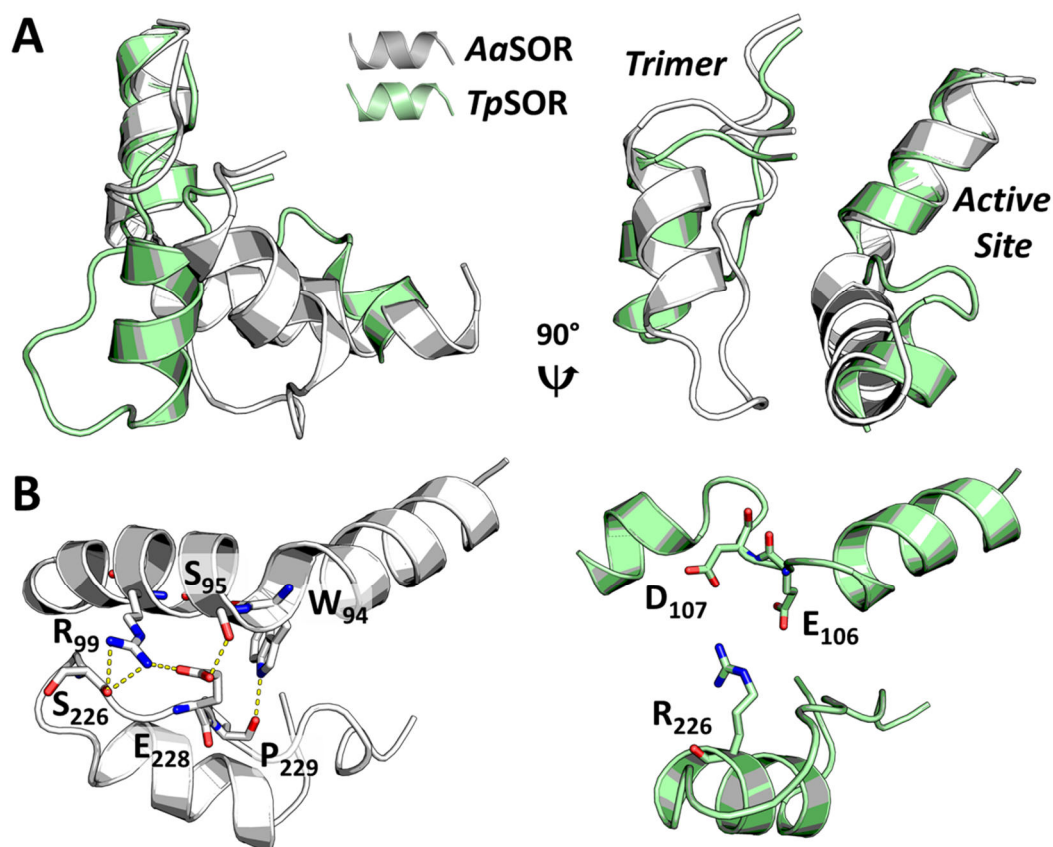
küls, da die Q<sub>76</sub>-Seitenkette keinerlei mögliche Interaktionspartner in dessen unmittelbarer Umgebung ( $> 3,5 \text{ \AA}$  in der AaS<sub>OR</sub>) besitzt. Mutagenese von T<sub>78</sub> zu Alanin oder Serin resultierten in stark schwankenden Enzymaktivitäten zwischen 5 und 55 % im Vergleich zum Wildtyp, abhängig von der jeweiligen Proteinpräparation. Dadurch, dass das Wassermolekül jedoch insgesamt vier Interaktionspartner besitzt, ist denkbar, dass die Deletion einer der Wasserstoffbrücken nicht ausreicht um das Wassermolekül aus der Koordinationssphäre zu lösen. Der hohe Grad der Konservierung, die räumliche Nähe zum katalytischen Eisen und dessen Sichtbarkeit auch in niedrig auflösenden Kristallstrukturen lassen jedoch eine mechanistische Beteiligung des Wassermoleküls oder seiner Bindungspartner während des Substratumsatzes vermuten.

### Interhelikale *loops* verändern die Architektur der *TpS*<sub>OR</sub> Bindungstasche

Wesentliche Unterschiede zwischen den S<sub>OR</sub>s ergeben sich im strukturellen Aufbau der Bindungstasche. Diese ist in der *TpS*<sub>OR</sub> nicht groß und geräumig, wie in 3D-Strukturen anderer Mitglieder der Proteinfamilie, sondern mehrfach durch interhelikale *loops* unterbrochen, welche in die eigentliche Bindungstasche hineinragen. Dies hat in Strukturanalysen unter Standardlösungsmittelradiusbedingungen ( $1,4 \text{ \AA}$ ) die Aufteilung der Bindungstasche in mehrere kleine Kavitäten ohne direkten Zugang zum Eisenatom zur Folge. Die verkürzte und unterbrochene  $\alpha$ -Helix 3 (s. Kap. 4 Abb. 4.1 und Abb. 5.5), in der sich die beiden benachbarten und konservierten Cysteine C<sub>113/116</sub> befinden, ist dabei maßgeblich für die strukturelle Abweichung im Vergleich zu anderen S<sub>OR</sub>s verantwortlich. Die Unterbrechung durch einen *loop* besteht aus insgesamt sieben Aminosäuren (<sub>104</sub>TFEDVVV<sub>110</sub>) und befindet sich in direkter räumlicher Umgebung zum katalytischen Eisenzentrum. Der *loop* ragt so weit in die Bin-

dungstasche hinein, dass sich V<sub>108</sub> in unmittelbarer Nähe zum Eisen befindet und so eine Eisen-Substrat-Interaktion im vorliegenden nativen Strukturzustand erschwert bzw. unmöglich macht. Die Bindungstasche selbst wird durch V<sub>109</sub> unterbrochen, welches sich durch die Ausstülpung des *loops* in direkter Nähe zu Q<sub>88</sub> befindet. Diese für S<sub>OR</sub>-Strukturen ungewöhnliche Bindungstaschenarchitektur war sowohl in der Röntgenkristallstruktur als auch in der Kryo-EM-Struktur sichtbar, mit nur leichten Abweichungen der interhelikalen *loop*-Region. Vergleiche der direkten Umgebung der entsprechenden *active site*- $\alpha$ -Helix zeigen, dass sich strukturgebende Elemente des Trimerkanals in direkter räumlicher Nähe befinden (Abb. 5.22). Die Trimerkanalhelix der *TpS*<sub>OR</sub> besitzt einen anderen Winkel gegenüber der  $\alpha$ -Helix 3 der *active site pocket* als in der AaS<sub>OR</sub>, was eine weite Öffnung der Trimerkanal-Pore bewirkt (s. Kap. 6 für Details), aber keinen direkten stereometrischen Einfluss auf die  $\alpha$ -Helix 3 der *active site pocket* hat. Vielmehr scheinen in der AaS<sub>OR</sub> Interaktionen zwischen Aminosäuren des Bereiches um den Trimerkanal mit solchen aus der *active site pocket* vorzuliegen, die für die Positionierung der *active site pocket*- $\alpha$ -Helix 3 verantwortlich sein könnten. In der *TpS*<sub>OR</sub> gibt es dagegen nur eine mögliche Interaktion zwischen R<sub>226</sub> aus dem Bereich des Trimerkanals und den beiden sauren Resten E<sub>106</sub> und D<sub>107</sub>. Die Aminosäuren liegen jedoch in der vorliegenden Konformation in zu großer Entfernung ( $> 6 \text{ \AA}$ ) für die Ausbildung einer möglichen Salzbrücke. Insgesamt besitzen die beteiligten Aminosäuren jedoch keine Konservierung über die S<sub>OR</sub>-Sequenzen, sodass die Notwendigkeit für die Ausbildung des vorliegenden Sekundärstrukturelements der *active site pocket* in der AaS<sub>OR</sub> unklar bleibt.

Betrachtet man sich die Flexibilität der entsprechenden Region wird deutlich, dass die durchschnittlichen atomaren Verschiebungsparameter in der *TpS*<sub>OR</sub>  $102,8 \text{ \AA}$  betragen, verglichen zu  $38,6 \text{ \AA}$  im homologen helikalen



**Abbildung 5.22** | Strukturelle Darstellung der strukturegebenden Trimerkanalhelix und der Helix 3 der *active site pocket* in AaSOR (grau) und TpSOR (grün). **A**, Vergleichende *Cartoon*-Darstellung der Sekundärstrukturelemente. **B**, Darstellung möglicher Interaktionen von Aminosäureresten.

Bereich der AaSOR. Der Bereich ist in der TpSOR demnach deutlich flexibler und könnte somit durch eine Umlagerung des *loops* dennoch eine Substratkatalyse ermöglichen. Entsprechend scheint es denkbar, dass die TpSOR durch *loop*-Bewegungen das Substrat effizienter umschließen kann als andere SORs und die *active site pocket* demnach eine feste Passform während der Katalyse bildet. Im Gegensatz dazu bilden die Bindungstaschen der AaSOR und der HnSOR einen geräumigen Reaktionsraum. Obwohl die meisten strukturegebenden Aminosäuren in AaSOR und HnSOR konserviert sind, weisen die *active site pockets* jedoch Änderungen in ihrer jeweiligen Geometrie auf (s. Kap. 6 für Details). Daher stellt sich die Frage, ob und inwiefern die Unterschiede der jeweiligen SOR-Bindungstasche die katalytischen Eigenschaften der Proteine verändern.

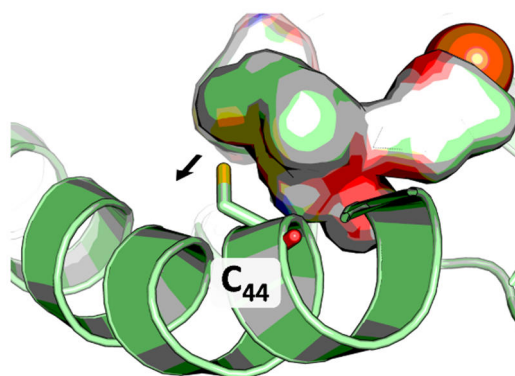
### Cystein-Modifikationen deuten auf S-Polymerisierung/Depolymerisierung hin

Mutationsanalysen der TpSOR und der HnSOR bestätigten die essentielle Rolle der beiden benachbarten Cysteine während der Katalyse, ebenso wie die beobachteten Modifikationen in der AaSOR-Kryo-EM-Struktur. Vorangegangene Untersuchungen, in denen die AaSOR mit inhibitorisch-wirkenden, organischen Di- und Trisulfiden inkubiert worden war, hatten in Röntgenkristallstrukturen Persulfurierungen an den Cysteinen C<sub>101</sub>-C<sub>104</sub> und Trisulfurierungen an C<sub>31</sub> gezeigt (Pöll, 2016). Eine C<sub>31</sub>-Persulfurierung in der AaSOR wurde zuvor lediglich in Kristallstrukturen beobachtet, in denen *E. coli* Gesamtextrakt einem Hitzeschritt unterzogen worden war, um thermolabile Proteine vor der Proteinreinigung zu fällen (Urich, 2005). Dies wurde auf eine Auto-Sulfurylierung mit Sulfiden aus dem

*E. coli* Gesamtextrakt zurückgeführt, da solche Modifikationen in folgenden AaSORS Kristallstrukturen ohne Hitze-Schritt nicht mehr aufgetreten waren (Veith, 2011). Auch in der Kristallstruktur der AtSOR sind alle drei konservierten Cysteine mit endständigen Thiolgruppen ohne entsprechende Modifikationen vorhanden (Li *et al.*, 2008). Weitere Versuche, gebundenes Substrat und/oder Reaktionsprodukte kristallographisch zu identifizieren, waren mit klassischen *soaking* Experimenten und Co-Kristallisationsversuchen, ebenso wie nach Vorinkubation des Enzyms bei 80 °C mit elementarem Schwefel oder Polysulfiden in der AaSORS gescheitert (Urich, 2005, Veith, 2011), wie auch im Rahmen der vorliegenden Arbeit mit der TpSOR (nicht gezeigt). Im Gegensatz dazu waren in der Kryo-EM-Struktur der AaSORS Cystein-Modifikationen vorhanden, auch ohne Hitzeinduktion und ohne Inkubation mit Substrat/Produkt. So war zwischen C<sub>101</sub>-Sy-Sy-C<sub>104</sub> eine durchgängige Elektronendichte vorhanden, die auf die Ausbildung von Tri- oder Tetrasulfidbrücken schließen lässt, neben einer Persulfurierung an C<sub>31</sub>. Vergleichbare Modifikationen waren in der nativen HnSOR-Röntgenkristallstruktur sichtbar, in der neben einer Persulfidmodifikation an C<sub>33</sub> (homolog zu C<sub>31</sub> in der AaSORS) Oligosulfidbrücken/Persulfide zwischen bzw. an C<sub>104</sub>-C<sub>106</sub>, ebenfalls ohne Hitze-Schritt, sichtbar waren (Pöll, 2016). Da sowohl AaSORS als auch HnSOR Cystein-Modifikationen ohne Hitzebehandlung aufweisen scheint es wahrscheinlich, dass beide Proteine während ihrer Bildung mit reduzierten Schwefelverbindungen im Cytoplasma von *E. coli* reagieren. Die TpSOR zeigte dagegen weder in der Röntgenkristall- noch in der Kryo-EM-Struktur vergleichbare Modifikationen an den Cysteinen. Folglich kann zurzeit nur über die Funktion des Schwefeltransfermechanismus an den beiden benachbarten Cysteinen spekuliert werden. Vergleichbare Oligosulfide wurden ebenfalls in Sulfid-Chinon (Oxido-) Reduktasen nachgewiesen. Hier wird während der Sulfidoxidation der Sulfan-

schwefel in einer Polymerisierungsreaktion sukzessive auf folgende Schwefelketten übertragen (Brito *et al.*, 2009, Marcia *et al.*, 2009). Tetrasulfidbrücken zwischen C<sub>101/103</sub>-C<sub>104/106</sub> in der AaSORS/HnSOR könnten demnach ein Intermediat einer reversen Reaktion sein, in der Polysulfide an die beiden konservierten Cysteine binden und anschließend in einer Depolymerisierungsreaktion zu kurzkettigen Intermediaten abgebaut werden (mögliche Polysulfid-Bindungen in der *active site pocket* sind in molekularen Docking-Analysen in Kapitel 6 gezeigt).

Die optisch unterbrochene Bindungstasche der TpSOR macht, zusammen mit dem vergrößerten Abstand zum aktiven Zentrum, die Interpretation der Rolle der beiden benachbarten Cysteine ungleich schwerer. Durch eine Umlagerung des kristallographisch beweglichen *loops* könnte es zwar zu einer Erweiterung der Bindungstasche kommen, so dass eine Substratkatalyse möglich erscheint, jedoch führten Energieminimierungen der TpSOR-Struktur nur zu geringfügigen Änderungen der generellen *active site pocket*-Konstitution. Die Berechnungen resultierten jedoch in einer Öffnung einer deutlich kleineren Bindungstasche, an der C<sub>44</sub> (Homolog zu AaSORS-C<sub>31</sub>) direkt beteiligt ist (Abb. 5.23).



**Abbildung 5.23** | TpSOR *active site pocket* nach Energieminimierung der Röntgenkristallstruktur. Die Bindungstasche verläuft vom katalytischen Eisenatom (braune Kugel) zum essentiellen C<sub>44</sub>. Ausgehend von C<sub>44</sub> besteht ein direkter Zugang zu dem „Zink-Kanal“ einer benachbarten Enzymuntereinheit (schwarzer Pfeil).

Diese Tasche entsteht durch leichte Umlagerungen der Aminosäurereste V<sub>108</sub>, T<sub>90</sub> und Q<sub>88</sub>, wobei letztere beide konserviert und für die Koordination von H<sub>2</sub>O<sup>3</sup> verantwortlich sind. Im Rahmen der Energieminimierung kam es ebenfalls zur Reorganisation von den Aromaten F<sub>53</sub>, F<sub>56</sub> und F<sub>301</sub> in unmittelbarer Nähe von C<sub>44</sub>, sodass ein optisch sichtbarer Zugang zum aktiven Zentrum entstand. Dieser Zugang ist im Holoenzym direkt an den so genannten „Zink-Kanal“ gekoppelt, welcher im *Tp*SOR-Wildtyp ein zweites Metallbindungszentrum darstellen könnte. Im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit wurde ein vergleichbarer Kanal ebenfalls in der *Aa*SOR und der *Hn*SOR identifiziert und als möglicher universeller Substrateingang in SORs definiert (s. Kap. 6 für Details).

Insgesamt zeigt die *Tp*SOR einen mit anderen SORs vergleichbaren Aufbau des Holoenzym mit einem verlängerten N-Terminus,

welcher der *Tp*SOR ein kantiges Erscheinungsbild verleiht. Unterschiede ergaben sich vor allem beim Redox-Zustand des katalytischen Eisens und dem generellen Aufbau der *active site pocket*. Die *Tp*SOR besitzt eine unterbrochene  $\alpha$ -Helix nahe des aktiven Zentrums, sowohl in der Röntgenkristall- als auch in der Kryo-EM-Struktur. Die im Vergleich zu anderen SORs verkleinerte Bindungstasche ermöglicht während der Katalyse eine genaue Passform um das Substrat. Der Zugang zum aktiven Zentrum ist in diesem Stadium lediglich über den so genannten Zink-Kanal möglich und führt direkt am essentiellen C<sub>44</sub> vorbei. Kryo-EM-Strukturen der *Tp*SOR – und auch der *Aa*SOR – legen dabei nahe, dass die Tasche des Zink-Kanals ein zweites Metallbindungszentrum in SORs darstellen könnte, wobei die Identität und die Funktion des vermeintlich gebundenen Metalls im Rahmen dieser Arbeit ungeklärt blieb.



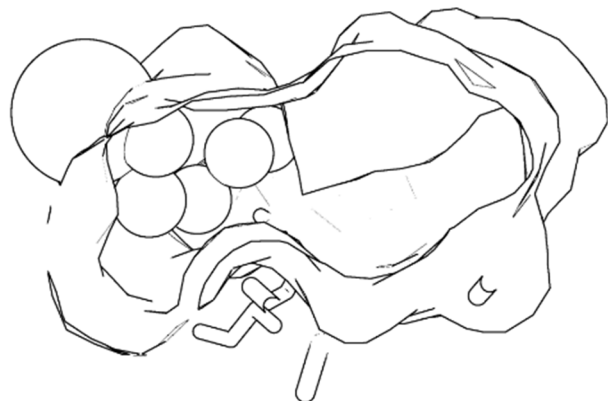
---

# KAPITEL 6

## Substrat- und Produktwege von SORs

---

Identifizierung möglicher Schwefeltransportwege  
und Bindungsstellen im aktiven Zentrum

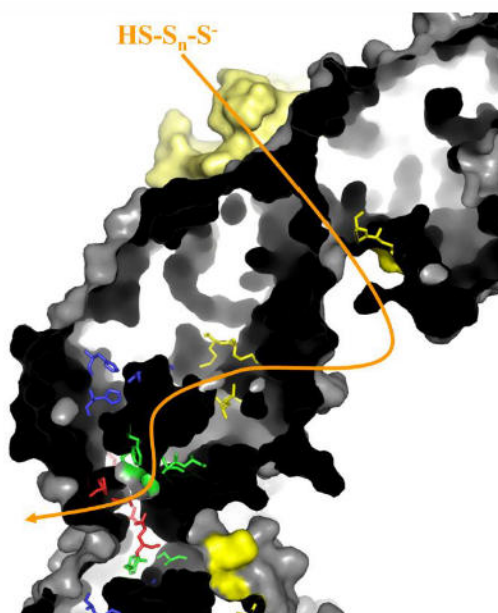


## Einleitung

Neben vielen ungeklärten Fragen bezüglich des Reaktionsmechanismus ist ebensowenig über mögliche Substrat- und Produktwege in den Holoenzymen bekannt. Die ballförmigen SORs haben molekulare Massen von ca. 845 kDa, bestehen aus 24 identischen Untereinheiten mit einer 432 Punktgruppensymmetrie und besitzen einen großen inneren Hohlraum (Urich *et al.*, 2006, Li *et al.*, 2008, Pöll, 2016 und Kapitel 5). Jede der Untereinheiten besitzt eine *active site pocket*, welche vom inneren Hohlraum aus erreichbar ist. In vorangegangenen Studien wurden unpolare Kanäle an der Vierfachsymmetrieachse (Tetramerkanäle) als möglichen Substrateingang für lineare Schwefelspezies von der Außenseite in den inneren Hohlraum ausgemacht, während der Ausgang der Reaktionsprodukte vermutlich über polare Kanäle an der Dreifachsymmetrieachse (Trimerkanäle) vermittelt wird (Urich *et al.*, 2006, Veith *et al.*, 2011). Mutagenesestudien des Tetramer- und des Trimerkanals führten zu einer vier- bis siebenfachen Erhöhung der Enzymaktivität in der AaSOR, wenn der Tetramerkanal verkürzt und damit weiter geöffnet wurde und einer bis zu fünffachen Erhöhung der Enzymaktivität wenn porenbildende Aminosäuren des Trimerkanals mutiert wurden, die eine Vergrößerung der Pore zur Folge hatten (Veith *et al.*, 2011). Dies deutete darauf hin, dass sowohl Substrateintritt als auch Produktaustritt aus dem inneren Hohlraum durch die Porenöffnungen der Proteinhülle eingeschränkt wird.

Eine weitere Pore wurde in der AaSOR identifiziert, die von den Aminosäureresten M<sub>296</sub>, M<sub>297</sub> und F<sub>23</sub> gebildet wird und aller Voraussicht nach den Zugang zum aktiven Zentrum vom inneren Hohlraum aus darstellt (Urich *et al.*, 2006, Veith *et al.*, 2011). Die 24 aktiven Zentren der SORs beinhalten jeweils ein mononukleares nicht-Häm Eisenatom und drei ebenfalls konservierte Cysteine. AaSOR-

C<sub>31</sub> und dessen Homologe in anderen SORs konnten bislang nicht ohne kompletten Aktivitätsverlust substituiert werden, wobei die Mutagenese der beiden benachbarten C<sub>101/104</sub> bzw. deren Homologe in einem starken Abfall der Enzymaktivität resultierten (Chen *et al.*, 2005, Urich *et al.*, 2005b, Rühl *et al.*, 2017 und Kapitel 4 für weitere Details). Trotz verschiedener Versuche strukturell Reaktionsintermediate im aktiven Zentrum zu visualisieren, war es bislang nicht möglich entsprechende Elektronendichte zu identifizieren (s. Kap. 5 für Details). Für die AaSOR wurde



**Abbildung 6.1** | Querschnitt des HnSOR-Holoenzym mit postulierten Substrat- und Produktwegen (orangener Pfeil) mit dem Tetramerkanal als Substrateingang und dem postulierten „Hinterausgang“ der das aktive Zentrum direkt mit dem Trimerkanal verbindet. Der schornsteinähnliche Tetramerkanal ist in Hellgelb dargestellt. Aminosäuren in gelb bilden die Eingangspore zum aktiven Zentrum. Die Eisenliganden sind in blau dargestellt. Grüne Aminosäuren kennzeichnen die porenbildenden Reste für den „Hinterausgang“ aus dem aktiven Zentrum. Aminosäuren, die die Trimerkanalpore bilden sind rot eingefärbt (Veith *et al.*, 2011).

postuliert, dass sowohl Substrateingang als auch Produktausgang aus dem aktiven Zentrum in den inneren Hohlraum über die gleiche Pore vermittelt wird. In der ansonsten sehr ähnlichen Struktur der SOR aus *Ac. tengchongensis* (88% Sequenzidentität zur AaSOR) wurde darüber hinaus ein so genannter „Hinterausgang“ gefunden, der das aktive Zentrum direkt mit dem Trimerkanal verbindet (Li *et al.*, 2008). Dieser Tunnel scheint auch in der HnSOR-Struktur vorhanden zu sein (Abb. 6.1), wohingegen er in der AaSOR durch Untereinheiten-Untereinheiten Interaktionen verschlossen zu sein scheint (Veith, 2011, Pöll, 2016). In einer ersten Software-gestützten Tunnelanalyse von SOR-Strukturen waren zusätzliche Verbindungen des

HnSOR-Holoenzym mit der äußeren Oberfläche identifiziert worden, die die Funktion des Tetramerkans übernehmen könnten (Pöll, 2016). Außerdem scheint die HnSOR ein komplexeres Tunnelnetzwerk verglichen mit der AaSOR zu besitzen.

In dieser Arbeit sollten weiterführende Tunnelanalysen der HnSOR- und AaSOR-, sowie der neu aufgeklärten TpSOR-Röntgenkristallstruktur erfolgen. Auf diese Weise sollten allgemein gültige Substrat- und Produkttrou-ten in SORs identifiziert werden. Molekulare Docking-Analysen von Polysulfiden an das Eisenzentrum sollten darüber hinaus ein detailliertes Bild von möglichen Schwefelkettenausrichtungen in der Bindungstasche von SORs vermitteln.

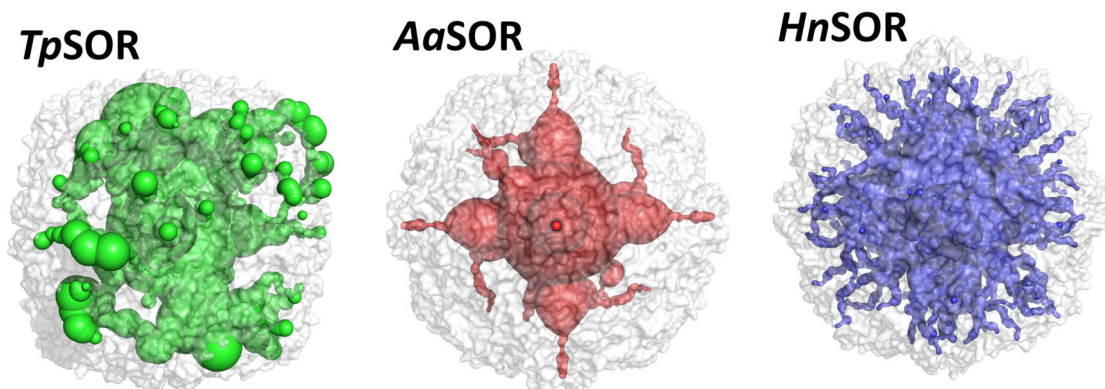
## Ergebnisse

### 6.1 Das Holoenzym

SOR Holoenzyme bilden große, kugelförmige Strukturen, die sich aus 24 einzelnen Untereinheiten zusammenlagern. Bei einem Durchmesser von  $\approx 15$  nm bilden sie dabei in ihrem Inneren einen Hohlraum, über den die 24 Untereinheiten miteinander verbunden sind (s. Kap. 5 für Details zum allgemeinen Aufbau von SORs). Tunnel-Analysen der 3D-Strukturen der *AaSOR*, *HnSOR* und *TpSOR* mit den Programmen MOLE (Sehnal *et al.*, 2013) und CAVER (Chovancova *et al.*, 2012) zeigten, dass sich Tunnelnetzwerke ausgehend von der zentralen inneren Kavität erstrecken und sowohl die einzelnen Untereinheiten miteinander, als auch das Enzyminnere mit der äußeren Oberfläche verbinden (Abb. 6.2). In den einzelnen SORs unterscheiden sich diese Tunnelnetzwerke jedoch deutlich, sowohl in der Form als auch in der Anzahl der verschiedenen Tunnel. Basierend auf diesen globalen Tunnelanalysen scheint die *AaSOR*, verglichen zu den beiden SORs aus Mesophilen, ein kompakteres Enzym darzustellen. Sie besitzt nur wenige Tunnel und hat die geringste Anzahl an Verbindungen zwischen innerer und äußerer Oberfläche. Die *HnSOR*

weist das umfangreichste Tunnelgeflecht auf, wobei die *TpSOR* die größten Tunnelöffnungen an der Proteinoberfläche besitzt (Abb. 6.2). In der *TpSOR* besitzen die meisten der Tunnel, welche die äußere Oberfläche mit dem inneren Hohlraum verbinden, jedoch Distanzen von  $> 60$  Å und wurden daher für weitere Analysen nicht berücksichtigt. Aufgrund der hohen Ähnlichkeit der SOR-Enzyme wurden bislang ähnliche Substrat- und Produktwege in allen SORs postuliert (Urich *et al.*, 2006, Veith *et al.*, 2012), wobei es bereits mit der Bestimmung der hochauflösenden Kristallstruktur der *HnSOR* erste Hinweise auf eine deutlich ausgedehnteres Tunnelssystem in der *HnSOR* verglichen mit der *AaSOR* gab (Pöll, 2016).

Allgemein wird angenommen, dass nicht der zyklische  $\alpha$ -S<sub>8</sub>-Schwefel, sondern vielmehr lineare Polysulfide die äußere Proteinoberfläche durch unpolare Kanäle passieren. Als wahrscheinlichsten Zugangspunkt zur internen Kavität der *AaSOR* dienen schornsteinähnliche Ausstülpungen an der Vierfachsymmetrieachse, die Tetramerkanäle (Urich *et al.*, 2006, Veith, 2011).

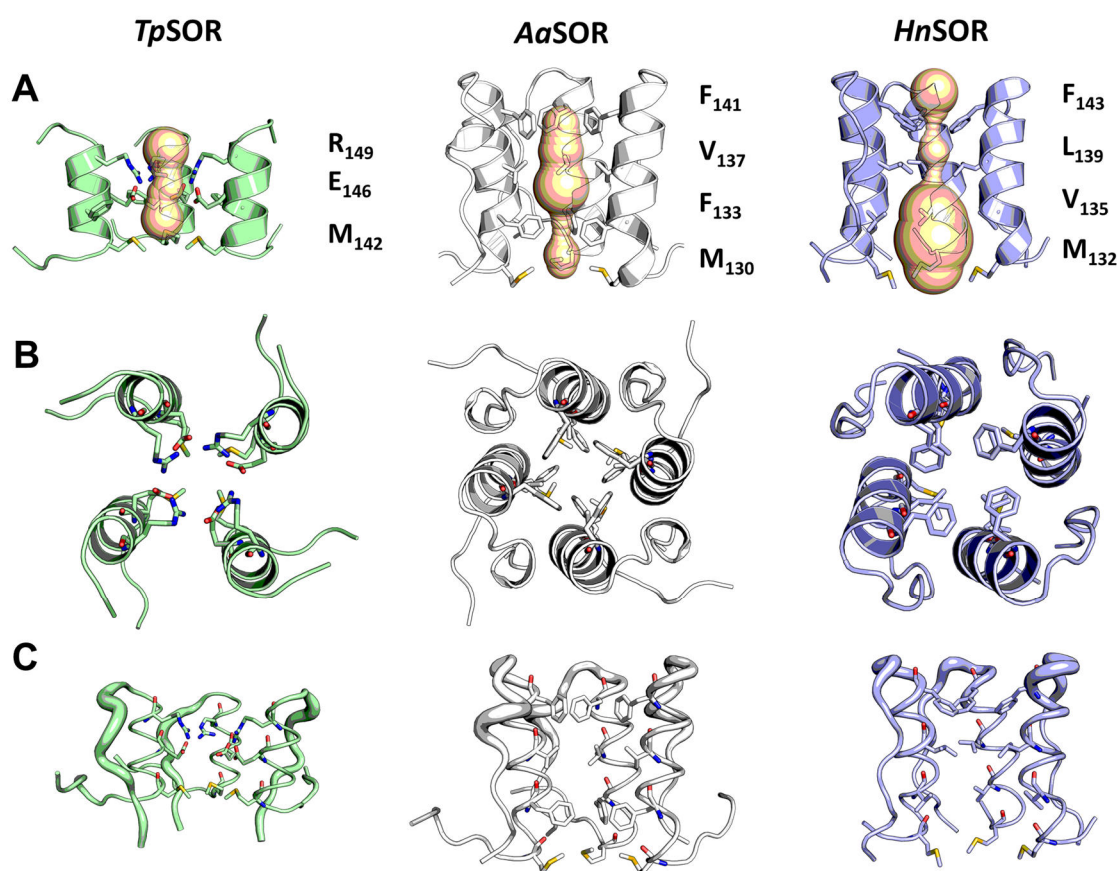


**Abbildung 6.2** | Innere Tunnelnetzwerke der *TpSOR*-, *AaSOR*- und *HnSOR*-Holoenzyme. Die Analysen wurden mittels dem Caver PyMOL-Plugin V 3.0 generiert. Als Startpunkt wurde jeweils der innere Hohlraum des Holoenzym gewählt.

## 6.2 Der Tetramerkanal

Vergleiche der Tetramerkanäle zeigten, dass diese in der *TpSOR* signifikant kürzer sind als in den beiden anderen SORs und eine grundlegend verschiedene Aminosäurezusammensetzung aufweisen (Abb. 6.3). Diese Änderung bewirkt einen Anstieg der Polarität der Tunnel um das Fünffache (berechnet mittels MOLE) bei einem durchschnittlichen Durchmesser von  $4,3 \pm 0,5$  Å, wobei der Durchmesser an der engsten Stelle 3,4 Å beträgt (für weitere Details der in diesem Kapitel beschriebenen Tunnel, siehe Anhang Tab. S.6.1-S.6.11 und Abb. S.6.1-S.6.11). In der *AaSOR* beträgt der mittlere Durchmesser 4,9  $\pm$  0,8 Å mit einer engsten Stelle von 4,0 Å, womit der Kanal weiter geöffnet ist als in der

*TpSOR*. Aufgrund des polaren Charakters und des geringen Durchmessers erscheint der Transport des hydrophoben Schwefels über diesen Kanal in der *TpSOR* zwar unwahrscheinlich, aufgrund des deutlich verkürzten Kanals muss das Substrat jedoch auch nur eine geringere Distanz bis in den inneren Hohlraum im Vergleich zu anderen SORs zurücklegen. In der *HnSOR* dagegen erscheint der Tetramer-Kanal generell zu klein für den Transport von Schwefelspezies. Die engste Stelle des *HnSOR*-Tetramerkansals wird durch einen Ring von vier ganz außen gelegenen Phenylalanin-Resten gebildet und hat einen Durchmesser von lediglich 1,6 Å (C-C-Abstände: 5,5 Å; Abb. 6.3 und Anhang Abb. S.6.12), gefolgt von einem Ring aus vier Leucin-Resten mit einem Durchmesser von 1,94 Å



**Abbildung 6.3** | Vergleiche der Tetramerkanäle der *TpSOR*, *AaSOR* und *HnSOR*. **A**, Seitenansicht mit drei von vier Untereinheiten der Tetramerkanäle. Die Hohlräume der Kanäle sind als Kugeln dargestellt. **B**, Aufsicht auf die Tetramerkanäle mit Seitenketten der kanalbildenden Aminosäurereste. **C**, Seitenansicht mit drei von vier Untereinheiten der Tetramerkanäle mit dargestellter Flexibilität der Tetramer-Regionen, basierend auf den kristallographischen a.d.p.s-Werten.

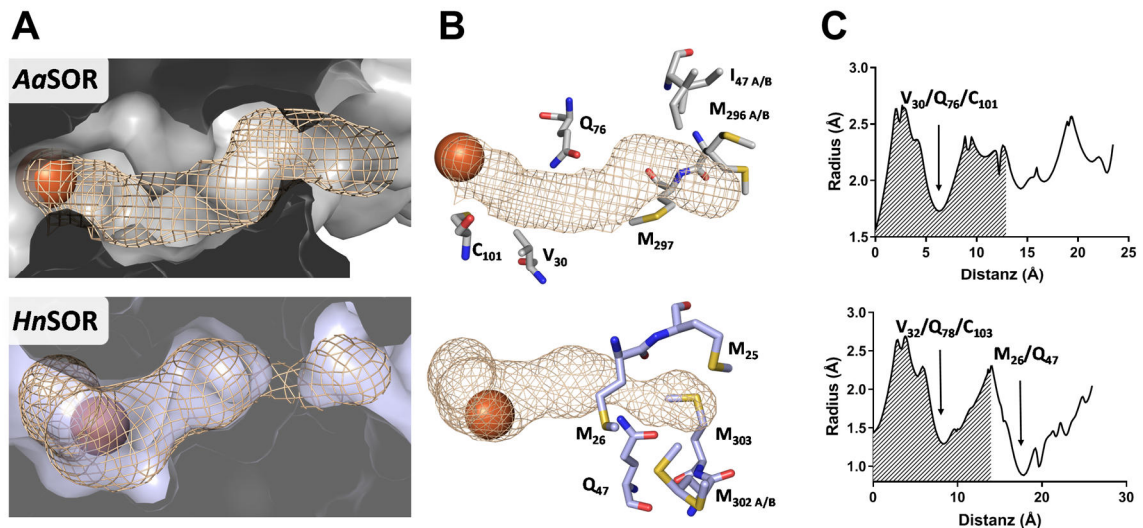
(C-C-Abstände 5,3 Å). Die Gesamtarchitektur der Tetramerkanäle der AaSOR und der HnSOR ist jedoch vergleichbar. In der AaSOR befinden sich die äußeren Phenylalanin-Reste in einer kristallographisch flexiblen Region gefolgt von einem Valin-Rest, der dem Leucinring in der HnSOR äquivalent ist. Die engste Stelle des AaSOR Tetramerkanaals mit einem Durchmesser von 4,0 Å befindet sich jedoch noch weiter innerhalb an einem zweiten Phenylalaninring in einer kristallographisch starren Region (Abb. 6.3 AC) (Urich *et al.*, 2006). In der HnSOR ist dagegen ein Valin-Rest an der entsprechenden Stelle lokalisiert, der aufgrund seiner kurzen Seitenkette den Übergang in die innere Kavität markiert. Im Gegensatz zu der AaSOR, in der die Phenylalanin-Seitenketten parallel zur Kanalachse ausgerichtet sind, befinden sich diese in der HnSOR senkrecht zu ihr stehend (Abb. 6.3 B).

In der HnSOR wurde zusätzlich ein weiterer Tunnel/Kanal in jeder Untereinheit identifiziert, der sich jeweils an der Basis der Ausstülpungen der Vierfachsymmetrieachse befindet und als Tetramer-Basistunnel definiert wird. Die Durchmesser dieser Tunnel betragen 3–4 Å bei einer Gesamtlänge von 30 Å. Die engste Stelle der Tunnel befindet sich direkt an der Porenöffnung der inneren Oberfläche mit einem Durchmesser von 2,6 Å und wird von den Aminosäuren Q<sub>267</sub>, S<sub>155</sub>, S<sub>156</sub> und H<sub>264</sub> gebildet. Die Tunneloberfläche besitzt einen hohen Grad an Polarität, ist jedoch deutlich hydrophober als der Tetramerkanal der TpSOR und besitzt kleine hydrophobe Bereiche. Dennoch erscheint der Tunnel aufgrund seiner Polarität eher ein alternativer Produktausgang als ein Substrateingang für Polysulfid zu sein. Weder in der AaSOR noch in der TpSOR wurde ein vergleichbarer Tetramer-Basistunnel gefunden. Jedoch wurden weitere Tunnel identifiziert, welche für den Transport von Substrat oder Reaktionsprodukten in Frage kommen (siehe folgende Unterkapitel).

### 6.3 Kanäle und Tunnel zum aktiven Zentrum

**Active site Pore.** Eine optisch leicht identifizierbare Zugangspore zum aktiven Zentrum wurde ausgehend von der inneren Kavität für die AaSOR in vorangegangenen Studien identifiziert und postuliert, dass sie den Hauptweg für Substrat und Produkte bildet (Veith *et al.*, 2011). Sie ist durch zwei konservierte Methionine M<sub>296</sub> und M<sub>297</sub> und die Aminosäuren F<sub>23</sub> und I<sub>47</sub> an ihrem Eingang definiert. Der Tunneldurchmesser ist mit durchschnittlich  $4,1 \pm 0,6$  Å zwar ausreichend groß, jedoch befindet sich die engste Stelle direkt hinter der Eingangspore und wird durch den Q<sub>76</sub>-Rest gebildet (Durchmesser  $3,6 \pm 0,2$  Å; Abb. 6.4). Bis zum jetzigen Zeitpunkt stellte diese Pore den einzigen bekannten Zugangspunkt zum aktiven Zentrum in SORs dar. Die HnSOR besitzt eine ähnliche Pore, die von den homologen Aminosäuren M<sub>302</sub>, M<sub>303</sub> und M<sub>25</sub> zusammen mit M<sub>26</sub> gebildet wird und damit leicht von der AaSOR-Pore abweicht. M<sub>302</sub> kommt in allen 24 HnSOR Untereinheiten in zwei verschiedenen Konformationen vor, von denen jedoch keine die Pore verschließt (Pöll, 2016). Der Durchmesser ist mit  $4,4 \pm 0,4$  Å leicht vergrößert im Vergleich zum äquivalenten Tunnel in der AaSOR, beträgt aber an der engsten Stelle lediglich  $1,76 \pm 0,3$  Å (Abb. 6.4). Gebildet wird die Engstelle von den *backbones* der Aminosäuren G<sub>29</sub> und M<sub>25</sub> und der Seitenkette von Q<sub>47</sub>. Die Tunneloberfläche ist in der HnSOR etwas weniger hydrophob als in der AaSOR (Hydrophobizität AaSOR :  $0,27 \pm 0,06$ ; HnSOR:  $-0,23 \pm 0,05$ ; berechnet mittels MOLE; Sehnal *et al.* (2013)), was wiederum auf einen möglichen Ausgangskanal für die Reaktionsprodukte in der HnSOR schließen lässt. Aufgrund der abweichenden Konstitution der *active site pocket* in der TpSOR (s. Kap. 5) wurde dieser Zugang zum aktiven Zentrum nicht gefunden.

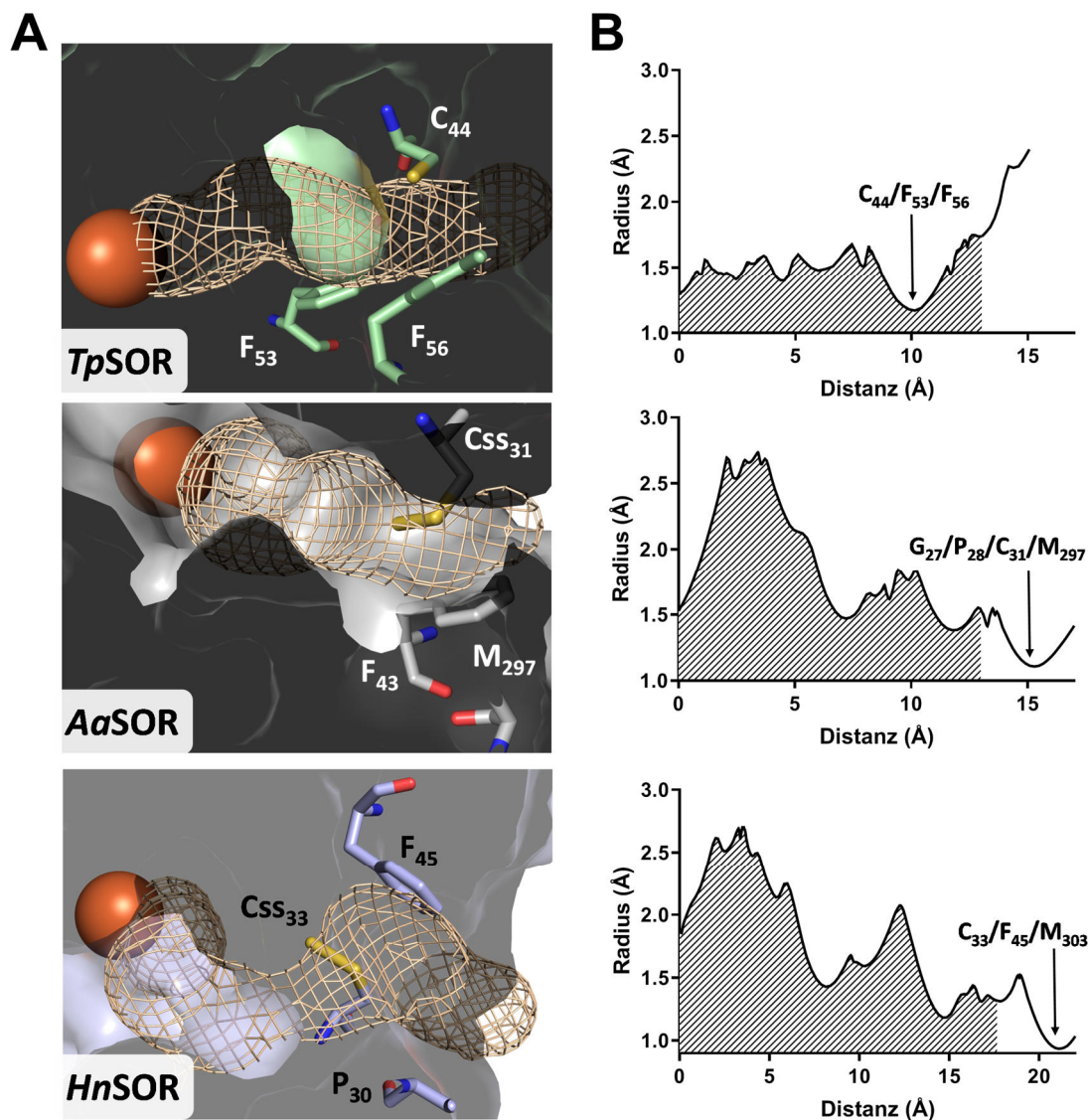




**Abbildung 6.4** | Putativer Kanal zum aktiven Zentrum in *AaSOR* und *HnSOR*. **A**, Oberflächendarstellung des jeweiligen Proteins. Die von MOLE2 berechneten Tunnel sind jeweils als Netz dargestellt. **B**, Darstellung des jeweiligen Kanals mit Aminosäureresten, die die engsten Stellen bilden. **C**, Verlauf des jeweiligen Tunnelradius in Korrelation mit dem Abstand zum katalytischen Eisenatom. Als Nullpunkt ist das Eisenzentrum definiert. Schattierungen zeigen die Bereiche der Bindungstasche an, nicht-schattierte Bereiche die Kanalregion. Eisenatome sind als braune Kugeln dargestellt.

**Zink/Css-Kanal.** Im Rahmen der Analysen wurde ein weiterer Tunnel/Kanal identifiziert, der von der inneren Enzymkavität zum aktiven Zentrum führt und in allen drei SORs vorhanden zu sein scheint. Dieser befindet sich in der Nähe der bisher beschriebenen Zugangspore zum aktiven Zentrum und führt über eine benachbarte Untereinheit direkt am essentiellen *AaSOR*-C<sub>31</sub> vorbei. Der neu identifizierte Tunnel bzw. Kanal zweigt direkt am persulfurierten Cystein C<sub>SS31</sub> vom sogenannten Zink-Kanal ab (Abb. 6.5; „Zink/Css-Kanal“). Letzterer war in der *AaSOR* so klassifiziert worden, da hier ein Zn<sup>2+</sup>-Ion pro Untereinheit an zwei konservierte Histidine in der Kristallstruktur des Zink-inhibierten Proteins gebunden war, die aber deutlich tiefer in dem „Zink-Kanal“ angeordnet sind als C<sub>SS31</sub> (Veith, 2011 und Kapitel 5). In diesem Tunnel/Kanal trennt das in der *AaSOR* und *HnSOR* persulfurierte Cystein C<sub>SS31</sub>/C<sub>SS33</sub>, bzw. C<sub>44</sub> in der *TpSOR* (neben anderen Aminosäureresten) die Bindungstasche des aktiven Zentrums von dem Zink-Kanal. Der Tunnel führt direkt durch den Zink-Kanal am per-

sulfurierten Cystein vorbei zum katalytischen Eisenatom. In der *TpSOR* hat der Zugang zum aktiven Zentrum über den Zink-Kanal und C<sub>44</sub> eine Länge von 16,5 Å bei einem mittleren Durchmesser von 3,4 Å und ist der einzige Zugangspunkt zum aktiven Zentrum, der in der *TpSOR* im Rahmen der Tunnelanalyse identifiziert wurde (Abb. 6.5). Die engste Stelle wird von C<sub>44</sub>, F<sub>53</sub> und F<sub>56</sub> gebildet, mit einem Durchmesser von 2,3 Å. In der *AaSOR* ist der Tunnel/Kanal mit 19,6 Å etwas länger und geräumiger, bei einem mittleren Durchmesser von 3,8 Å (Abb. 6.5). Die engste Stelle des *AaSOR*-Zink/Css-Kanals wird von den *backbones* der Aminosäuren G<sub>27</sub> und P<sub>26</sub>, sowie von den Resten C<sub>SS31</sub> und M<sub>297</sub> gebildet und hat ebenfalls einen Durchmesser von 2,3 Å. Der äquivalente Zink/Css-Kanal in der *HnSOR* besitzt eine Länge von 25,2 Å, bei einem mittleren Durchmesser von 3,9 Å, vergleichbar mit dem der *AaSOR*. Die engste Stelle des Kanals wird von den Resten C<sub>SS33</sub>, M<sub>303</sub> und F<sub>45</sub> gebildet, mit einem Durchmesser von 1,9 Å. Alle drei Tunnel besitzen keine hohe Polarität, weshalb es eine Substratpassage wahrschein-



**Abbildung 6.5** | Darstellung der Zink/Css-Kanäle zu den aktiven Zentren der *TpSOR*, *AaSOR* bzw. *HnSOR*. **A**, Oberflächendarstellung des jeweiligen Proteins. Die Tunnel sind jeweils als Netz, die Eisenatome als braune Kugeln dargestellt. **B**, Verlauf des jeweiligen Tunnelradius in Korrelation mit dem Abstand zum katalytischen Eisenatom. Als Nullpunkt ist das Eisenzentrum definiert. Schattierungen zeigen die Bereiche der Bindungstasche an, nicht-schattierte Bereiche die Kanalregion. Tunnelberechnungen erfolgten mit MOLE2.

lich macht. Auch die Beteiligung der essentiellen  $Css_{31}/Css_{33}/Cys_{44}$  deutet daraufhin, dass Substrat möglicherweise über diesen Tunnel/Kanal ins aktive Zentrum gelangt mit anschließender direkter Bindung durch Thiol-Disulfid-Austausch mit  $Css_{31}$  bzw.  $Css_{33}$  oder auch mit  $Cys_{44}$  in der *TpSOR*, wobei in letzterer bislang keine Persulfidmodifikation nachgewiesen wurde, weder in Röntgenkristall- noch in Kryo-EM-Strukturen (s. Kap. 5 für Details).

„**Hinterausgänge**“. In der Kristallstruktur der *AtSOR* war ein „Hinterausgang“ neben der ursprünglichen *active site* Pore identifiziert worden, der die Bindungstasche des aktiven Zentrums direkt mit der äußeren Proteinoberfläche verbindet (Li *et al.*, 2008). Ein ähnlicher Tunnel war in der *HnSOR* detektiert worden, wobei in der *AaSOR* die Ausgangspore durch eine benachbarte Untereinheit versperrt war (Veith, 2011, Pöll, 2016). Mutagenesen, die eine Porenöffnung in der

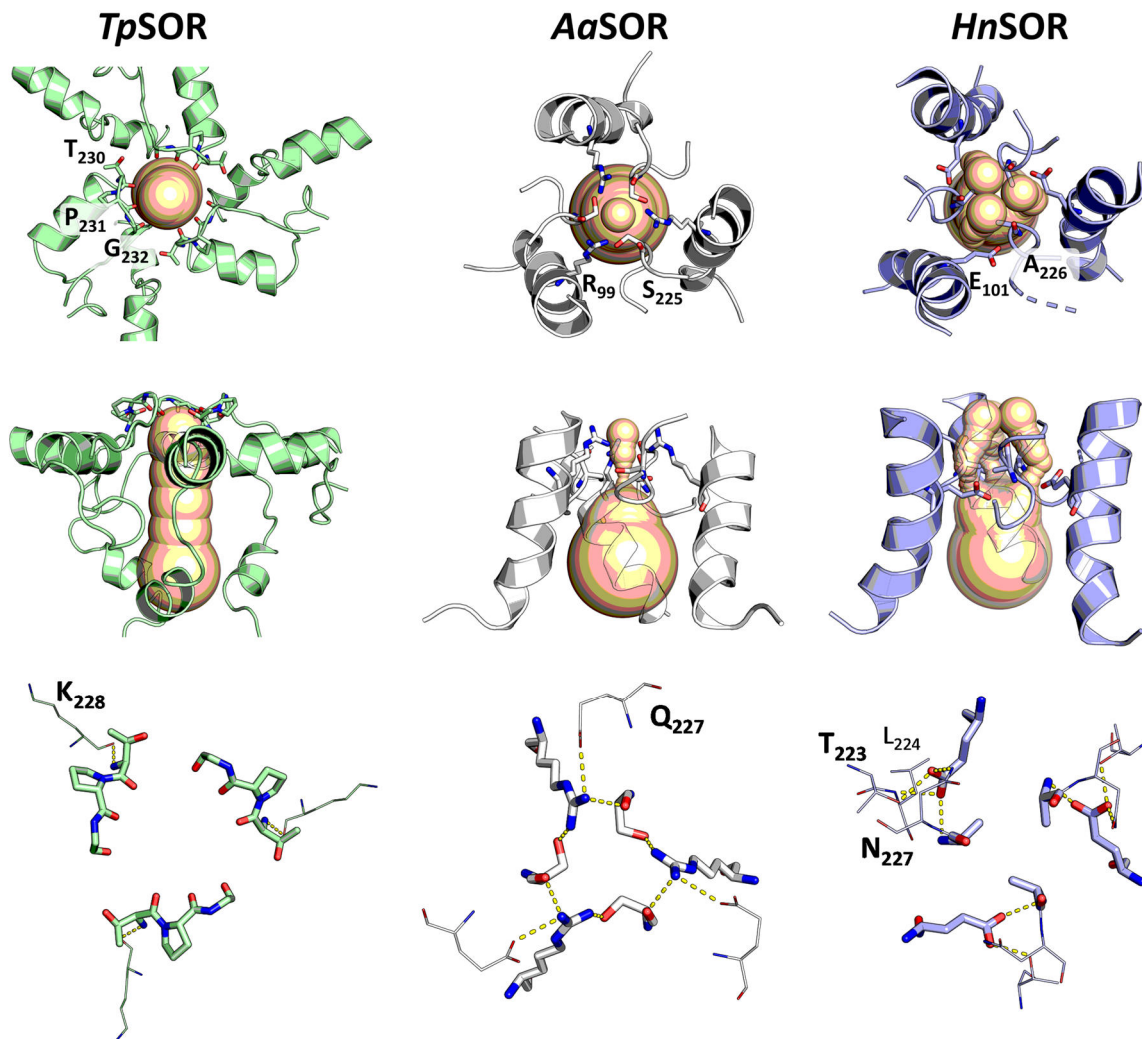
AaSOR und eine Schließung der Pore in der HnSOR bewirken sollten, wurden kristallographisch zwar bestätigt, die entsprechenden Enzymaktivitäten veränderten sich jedoch in wenig aussagekräftiger Weise (Pöll, 2016). Die Analysen im Rahmen der vorliegenden Arbeit zeigten jedoch weitere Tunnel, die in der HnSOR, im Gegensatz zur AaSOR, einerseits die Bindungstasche des aktiven Zentrums mit der inneren Kavität und sogar die Bindungstasche des aktiven Zentrums direkt mit der äußeren Enzymoberfläche verbinden. Einer dieser Tunnel ist kurz, mit einer Länge von ca. 13 Å, wobei der andere der beiden Tunnel eine Länge von 71 Å besitzt und aufgrund dessen wahrscheinlich keine Funktion als Produktausgang oder Substrateingang hat. Die Hinterausgänge des aktiven Zentrums haben die höchste Polarität, verglichen mit allen anderen identifizierten Tunneln. Es konnte jedoch nicht geklärt werden, inwiefern die Vielzahl der identifizierten Tunnel eine Rolle im Substrat- und/oder Produkttransport einnehmen – und damit als Kanäle einzustufen sind – und welche am wichtigsten für die Enzymaktivität der HnSOR sind.

## 6.4 Der Trimerkanal

Der Trimerkanal befindet sich an der Dreifachsymmetrieachse der SORs und war aufgrund seiner Polarität als möglicher Produktausgang zur äußeren Oberfläche der AaSOR definiert worden (Urich *et al.*, 2006). In der HnSOR wird die Pore des Trimerkanals von den Aminosäuren A<sub>226</sub> und E<sub>101</sub> gebildet, die homologen Reste in der AaSOR sind S<sub>226</sub> und R<sub>99</sub>. Die Pore des Trimerkanals ist in der TpSOR, im Gegensatz zu den anderen SORs, weit geöffnet und wird von den *backbones* der Aminosäuren T<sub>230</sub>, P<sub>231</sub> und G<sub>232</sub> gebildet. In der HnSOR sind beide Sauerstoffatome der Carboxylseitenkette von E<sub>101</sub> in Wasserstoffbrückendistanz von  $\approx 3$  bzw. 4 Å zum  $\alpha$ -Amid-Stickstoff von A<sub>226</sub> und zum  $\delta_2$ -Stickstoff des benachbarten Asparagins N<sub>227</sub> (2,9 Å). In der

AaSOR bilden die beiden Stickstoffatome der Guanidinogruppe von R<sub>99</sub> Wasserstoffbrücken zum Sauerstoff bzw. dem *backbone* Sauerstoff des Serins und zu E<sub>227</sub> aus. Im Gegensatz dazu werden die porenbildenden Aminosäuren des kristallographisch beweglichen *loops* in der TpSOR durch keine Interaktionen stabilisiert. Insgesamt bilden die Trimerkanäle in allen drei SORs jeweils ein sehr polares Umfeld und sind demnach deutlich hydrophiler als die Tetramerkkanäle, insbesondere in der AaSOR und der HnSOR, in denen zusätzliche polare Aminosäurereste (HnSOR: N<sub>227</sub>; AaSOR: E<sub>228</sub>) Wasserstoffbrücken zu den porenbildenden Aminosäuren ausbilden (Abb. 6.6). Dementsprechend ist es wahrscheinlich, dass der Trimerkanal als Produktausgang für die polaren Reaktionsprodukte der SORs dient, wie es bereits zuvor mehrfach postuliert worden war (Li *et al.*, 2008, Veith *et al.*, 2011).

Nichtsdestotrotz beträgt der minimale Porendurchmesser in der AaSOR bzw. der HnSOR 1,3 – 1,4 Å, was zu eng für den Transport der Reaktionsprodukte wie Sulfit und Thiosulfat mit ionischen Durchmessern von 3 Å zu sein scheint. Die Engstelle ist dabei auf einen sehr kleinen Bereich beschränkt, nahe der Aminosäuren A<sub>226</sub> in der HnSOR bzw. S<sub>226</sub> in der AaSOR. Die kristallographischen a.d.p.s sind in der Region in beiden Enzymen hoch, was auf eine gewisse Flexibilität der Pore schließen lässt (36-49 Å<sup>2</sup> in der AaSOR 29-59 Å<sup>2</sup> in der HnSOR). Entsprechend erscheint es möglich, dass eine kurzzeitige Porenerweiterung stattfinden kann, insbesondere bei hohen Reaktionstemperaturen. In jedem Fall ist an dieser Stelle ein Produktausgang wahrscheinlicher als an den Tetramerkkanälen, welche zumindest in der AaSOR und der HnSOR zu hydrophob und auch zu eng für die polaren Reaktionsprodukte sind. Die Frage stellt sich jedoch weiterhin, welche Rolle die zusätzlichen Kanäle in der TpSOR besitzen, die zwar zu lang für einen Substrat-/Produkttransport erscheinen, deren Transportfunktionen jedoch nicht gänzlich auszuschließen sind, ebenso wie in der HnSOR.



**Abbildung 6.6** | Trimerkanäle der *TpSOR*, *AaSOR*, und *HnSOR*. Obere Panels, Aufsicht auf die Trimerkanäle mit porenbildenden Aminosäureresten. Mittlere Panels, Seitenansichten auf die Trimerkanäle mit porenbildenden Aminosäureresten. Die Hohlräume der Kanäle sind jeweils als Kugeln dargestellt. Untere Panels, Reste in Wasserstoffbrückendistanz zu den porenbildenden Aminosäuren des jeweiligen Trimerkanals.

## 6.5 Identifizierung möglicher Substratbindungsstellen

Zentraler Punkt der *active site pocket* in SORs stellt ein Eisenion dar, welches von je zwei konservierten Histidin-Resten und einem zweizähnigem Glutamat-Rest zusammen mit zwei Wassermolekülen koordiniert wird. Verglichen mit der *AaSOR* liegt das Eisenzentrum der *HnSOR* tiefer im Enzyminneren, ausgehend von der zentralen inneren Kavität (20,7 Å bzw. 27,7 Å). In unmittelbarer Nähe zum Eisenatom befindet sich ein Cystein, welches in den hochauflösenden *AaSOR*- bzw.

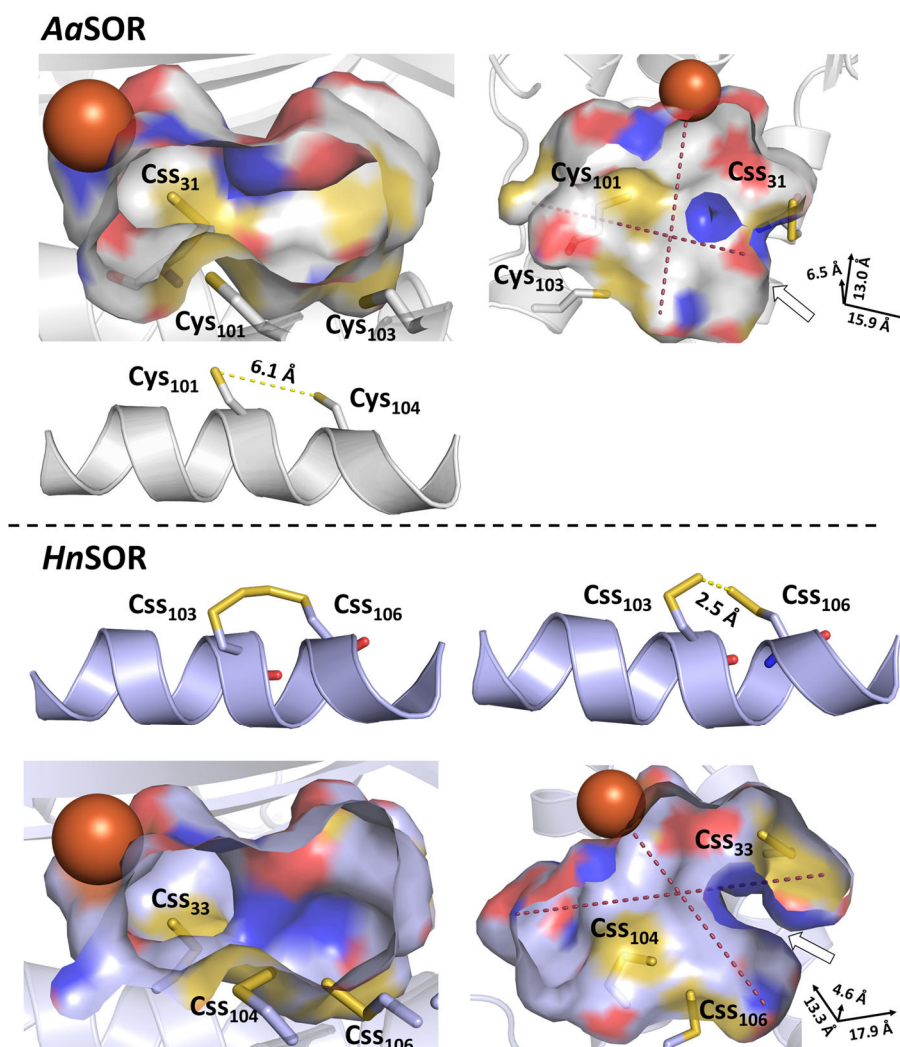
*HnSOR*-Strukturen persulfuriert und essentiell für die Enzymaktivität ist. Zwei weitere Cysteine sind ebenfalls von großer Bedeutung für die Enzymaktivität. Während diese in der *AaSOR* als herkömmliche Thiole vorkommen (S-S-Abstand 6,1 Å), sind die Homologen in der *HnSOR* entweder ebenfalls persulfuriert oder bilden eine Tetrasulfidbrücke aus (Abb. 6.7; Pöll, 2016). Die Bindungstasche der *TpSOR* ist dagegen durch einen interhelikalen *loop* separiert, weshalb sie optisch zunächst



nur mit einem geringen Lösungsmittelpfadradius von 1,0 Å erfasst werden konnte (s. Kap 5 für Details). Nach Energieminimierung der *TpSOR*-Röntgenkristallstruktur kam es zu einer leichten Umlagerung des *active site loops*, sodass auch bei Standardlösungsmittelpfadradien von 1,4 Å eine Bindungstasche in der *TpSOR* identifiziert werden konnte (s. Kap 5, Abb. 5.14 für einen strukturellen Vergleich der SOR-Bindungstaschen).

Gemittelt über alle Enzymuntereinheiten besitzt die Bindungstasche der *AaSOR* mehr Wasserstoffbrücken-Donoren und -Akzeptoren verglichen mit der *HnSOR* und bildet

mehr hydrophobe Interaktionen aus (Tab. 6.1). Betrachtet man sich die Aminosäurezusammensetzung, bestätigt sich dies mit einem höheren Vorkommen nicht-polarer Aminosäuren in der *AaSOR* und einem deutlich erhöhten Verhältnis von positiv zu negativ geladenen Aminosäuren. Vergleiche der *AaSOR* mit der *TpSOR* ergaben dagegen eine vergleichbare Zahl an Wasserstoffbrückenakzeptoren und hydrophoben Interaktionen. Dafür scheint die Bindungstasche der *TpSOR* eine signifikant erhöhte Anzahl Aminosäuren mit einer negativen Ladung zu besitzen (s. Kap. 4; Abb. 4.10).



**Abbildung 6.7** | Dimensionen der aktiven Zentren und der Bindungstaschen von *AaSOR* und *HnSOR*. Obere Panels (*AaSOR*), Darstellung der Bindungstasche mit ihren Ausmaßen und Orientierung der konservierten Cystein-Reste. Untere Panels (*HnSOR*), gespiegelte Darstellung wie für die *AaSOR*. Zusätzlich sind zwei verschiedene Konformationen der *Cys*<sub>103/106</sub> Seitenketten mit und ohne Ausbildung einer Tetrasulfidbrücke gezeigt.

**Tabelle 6.1** | Parameter der Substratbindungstasche in *TpSOR*, *AaSOR* und *HnSOR*. Die Werte sind jeweils für die repräsentativen A-Untereinheiten der *TpSOR*/*AaSOR* bzw. für die N-Untereinheit der *HnSOR* berechnet<sup>1</sup>.

		<i>AaSOR</i>	<i>HnSOR</i>	<i>TpSOR</i> <sup>2</sup>
<b>Größe und Form</b>	Volumen (Å <sup>3</sup> )	1253,4	1030,9	732,9
	Oberfläche (Å <sup>2</sup> )	1114,8	943,9	933,4
	Tiefe (Å)	20,7	24,2	23,2
<b>Funktionelle Gruppen</b>	H-Brücken Akzeptoren	59	55	58
	H-Brücken Donoren	17	14	12
	Hydrophobe Interakt.	55	40	47
	Hydrophobizitäts-Quotient	0,42	0,36	0,40
<b>Aminosäure-Zusammensetzung</b>	Apolarer Quotient	0,59	0,57	0,55
	Polarer Quotient	0,28	0,32	0,19
	Positiver Quotient	0,07	0,05	0,09
	Negativer Quotient	0,04	0,05	0,15

<sup>1</sup> Parameter berechnet mittels der DoGSiteScorer Bindungsstellenerkennung (Volkamer *et al.*, 2012).

<sup>2</sup> Substratbindungstasche nach Energieminimierung der A-Untereinheit. Die „active site pocket“ ist äquivalent zu der Darstellung in Kap. 5, Abb. 5.13, welche bei einem Lösungsmittelradius von 1,0 Å dargestellt ist.

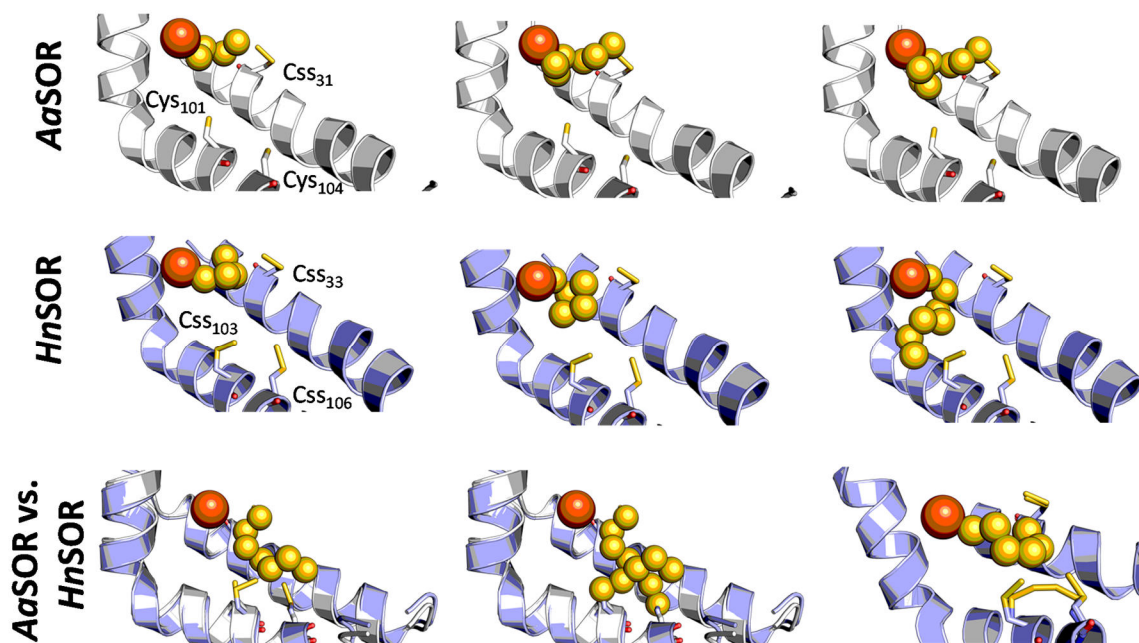
Das durchschnittliche Volumen der Bindungstaschen beträgt 1 215 Å<sup>3</sup> in der *AaSOR*, 1 025 Å<sup>3</sup> in der *HnSOR* und 733 Å<sup>3</sup> in der *TpSOR*. Dementsprechend ist auch die Oberfläche in der *AaSOR* Bindungstasche etwas größer als in der *HnSOR*. Aufgrund dessen, dass die *TpSOR* keine typische *active site pocket* ausbildet, sondern vielmehr eine Art Tunnelgeflecht, ist die Oberfläche jedoch vergleichbar mit jener aus der *HnSOR* (Tab. 6.1). Zumindest in *AaSOR* und *HnSOR* ist es aufgrund des geräumigen, voluminösen Charakters unwahrscheinlich, dass eine der Bindungstaschen eine genaue Orientierung von Substrat und Produkten vorgibt, wie es in vielen anderen Mono- oder Dioxygenasen mit organischen Substraten der Fall ist, sondern eine mehr oder weniger gut definierte Reaktionskammer mit signifikanten Freiheits- und Variationsgraden darstellt.

Die Variabilität der Substratbindung wird deutlich, wenn Polysulfide mit verschiedenen Kettenlängen für Docking-Analysen mit nachfolgender Energieminimierung genutzt werden. In der *AaSOR* resultierte dies in einer konsistenten Ausrichtung der Polysulfidkette zum essentiellen und persulfurierten C<sub>31</sub>, ausgehend vom Eisenatom (Abb. 6.8). Docking-

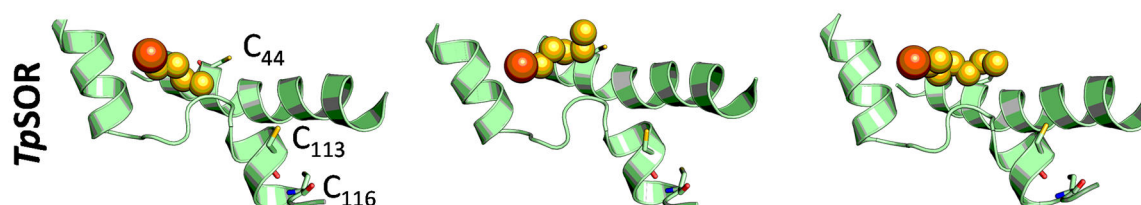
Analysen der *HnSOR* zeigten eine ähnliche Ausrichtung der n<sub>4</sub>-Polysulfidkette, wohingegen Polysulfidketten mit einer Anzahl an Schwefelatomen von n > 4 entweder mittig in die Bindungstasche hineinragten oder zu einer Kavitätenerweiterung in der Nähe von C<sub>103</sub> führten. In der *AaSOR* ist diese Erweiterung geringer ausgeprägt, weshalb die Modellierung einer Polysulfidkette mit n ≥ 7 aufgrund sterischer Hinderungen fehlschlug.

Mit der *TpSOR* ergaben die Software-gestützten Docking-Ansätze keine möglichen Substrat-Eisen-Interaktionen. Dies ist womöglich auf die zu kleine Bindungstasche in der *TpSOR* zurückzuführen, die zwar durch Energieminimierung sichtbar wurde, jedoch eher ein Tunnelgeflecht als eine geräumige Bindungstasche bildet. Um dennoch mögliche Eisen-Schwefel-Interaktionen in der *TpSOR* zu visualisieren und eine Vorstellung von der Substratorientierung zu bekommen – gerade im Hinblick auf Unterschiede zu den anderen beiden SORs – wurden Polysulfide in der *TpSOR* manuell an das katalytische Eisenatom gekoppelt und die Struktur daraufhin mit dem Fe-S<sub>n</sub>-Komplex energieminimiert. Dieser Ansatz resultierte mit Polysulfiden unterschiedlicher Kettenlänge (n = 4, 5 und 7) zu einer





**Abbildung 6.8** | Darstellung von Bindungsstellen von Polysulfidketten verschiedener Länge in der *AaSOR* bzw. der *HnSOR* nach *docking* und Energieminimierung. Obere und mittlere Panels: Bindung von Polysulfid ( $n = 4, 7, 8$ ) an die Eisenzentren von *AaSOR* und *HnSOR*. Untere Panels: Überlagerung der *AaSOR*- und der *HnSOR*-Struktur mit der Bindung von Polysulfidketten ( $n = 7$ ) an die konservierten Cystein-Reste (linkes und mittleres Panel) bzw. an das Eisenatom (rechtes Panel). Das Eisenatom ist jeweils als braune Kugel dargestellt.



**Abbildung 6.9** | Manuelles strukturelles Docking von Polysulfiden (Länge der Polysulfidkette jeweils  $n = 4, 5, 7$ ) an das katalytische *TpSOR*-Eisenzentrum. Die Struktur wurde nach dem Docking mittels der Yasara-Software Kraftfeld-optimiert und energieminimiert.

konsistenten Orientierung zum essentiellen  $C_{44}$ , analog zu den meisten Bindungszuständen, die in *AaSOR* und *HnSOR* ermittelt wurden (Abb. 6.9). Die Polysulfidbindungen mit anschließender Energieminimierung resultierten, insbesondere bei Polysulfidketten mit  $n = 5$ , zu einer leichten Verschiebung des interhelikalen *loops*, ohne jedoch eine geräumige Bindungstasche zu bilden. Die Orientierung der Polysulfidkette entspricht dabei der

möglichen Zugangspore zum aktiven Zentrum über den Zn/Css-Kanal, der ebenfalls in der *AaSOR* und *HnSOR* als wahrscheinlichen Substrateingang identifiziert wurde (Vgl. Abb. 6.5).

Für die Berechnung der freien Enthalpien in *AaSOR* und *HnSOR* wurden alle Bindungszustände der jeweiligen Polysulfidketten mit direkter Interaktion zum Eisenatom gemittelt, bzw. deren energetisch günstigste Bindung

**Tabelle 6.2** | Übersicht der kalkulierten freien Enthalpie der AaSOR bzw. der HnSOR mit Polysulfidketten verschiedener Längen als Substrat.

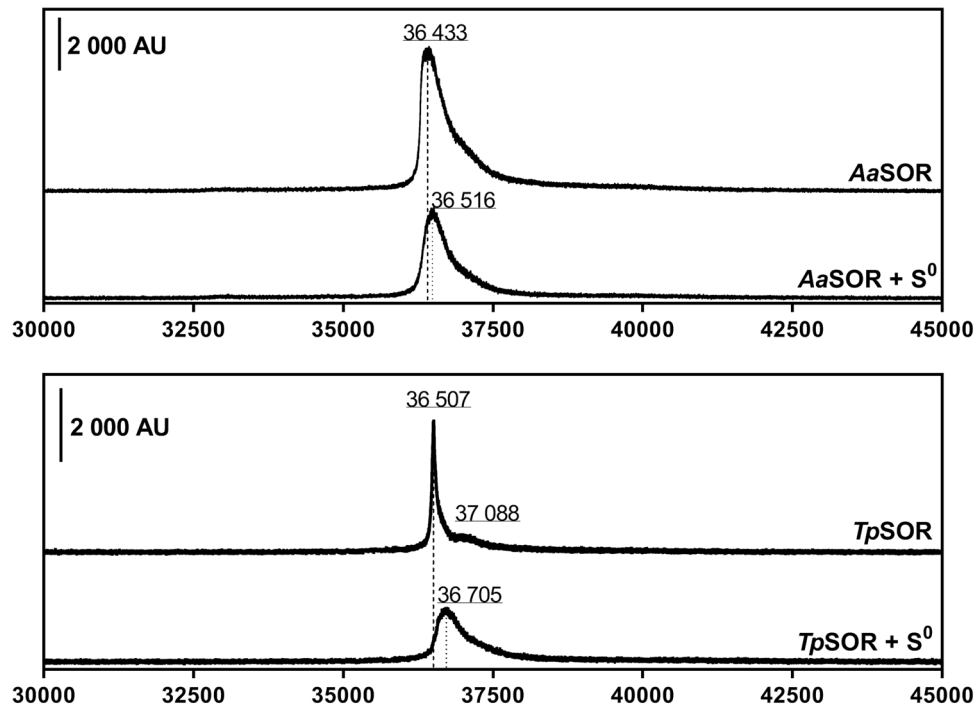
		Mittelwert <sup>1</sup>				„Best Fit“			
$\Delta G$ (kcal mol <sup>-1</sup> )		Pss4	Pss5	Pss6	Pss7	Pss4	Pss5	Pss6	Pss7
<b>Fe<sup>2+</sup></b>	<b>AaSOR</b>	5,3	12,6	21,8	18,4	0,7	7,1	7,1	6,8
	<b>HnSOR</b>	4,8	11,1	22,0	27,1	3,0	3,4	4,0	7,2
<b>Fe<sup>3+</sup></b>	<b>AaSOR</b>	-12,6	- <sup>2</sup>	0,1	5,5	-16,0	- <sup>2</sup>	-2,6	3,2
	<b>HnSOR</b>	-16,3	-6,9	16,3	2,6	-23,4	-13,5	-0,1	-4,0

<sup>1</sup> Aus allen gefundenen Bindungszuständen mit  $\Delta G \leq 40,6$  kcal mol<sup>-1</sup>.<sup>2</sup> Aufgrund sterischer Hinderungen war keine energetisch günstige Bindung an das Eisenzentrum möglich.

dargestellt („Best Fit“; Tab. 6.2; Eine Berechnung dieser Parameter war in der TpSOR aufgrund des manuellen Dockings nicht möglich). Die errechneten freien Enthalpie-Werte zeigten eine favorisierte Bindung von kürzeren Polysulfidketten im Fe<sup>3+</sup>-Zustand, wobei Kettenlängen von bis zu sechs Schwefelatomen in der AaSOR und bis mindestens sieben Schwefelatomen in der HnSOR energetisch günstig waren. Dagegen wiesen alle Bindungen im Fe<sup>2+</sup>-Zustand ein  $\Delta G > 0$  auf, was eine Bindung von Polysulfiden zumindest theoretisch unwahrscheinlich macht, unter der Annahme, dass das Eisenzentrum durch die Polysulfidbindung reduziert werden muss. Dies wäre nur in einem Fe<sup>3+</sup>-Zustand möglich, wobei ebenso eine (vorübergehende) Polysulfidbindung unter Beibehaltung des Fe<sup>3+</sup>-Zustandes denkbar erscheint.

Überlagerungen der AaSOR- und HnSOR-Strukturen zeigten, dass die Sy-Atome in AaSOR und HnSOR zwar eine ähnliche Orientierung besitzen, jedoch einen leicht abweichenden, aber signifikanten Abstand zueinander haben (vgl. Kap. 5, Abb. 5.14 + 5.15). Interessanterweise zeigten Docking-Analysen mit den Cysteinen als Fixpunkt mögliche Übergangszustände der Polysulfid-Bindung an die beiden benachbarten, konservierten Cystein-Reste C<sub>101/104</sub> und C<sub>103/106</sub> (AaSOR/HnSOR), die mit der Ausbildung der Tetrasulfidbrücke in der Kristallstruktur der HnSOR korrelieren. So befanden sich die persulfurierten Cysteine C<sub>ss103</sub> und C<sub>ss106</sub> in der HnSOR

in einem mittleren Abstand von 2,5 Å zueinander (Abb. 6.7). Modellierungen von Polysulfidketten mit einer Kettenlänge von  $n = 7$  zeigten, dass sich eines der Schwefelatome der Polysulfidkette genau zwischen die beiden S $\delta$ -Atome anlagert und sich so eine Schwefelbrücke zwischen ihnen bilden könnte (Abb. 6.8 AaSOR vs. HnSOR, linkes und mittleres Panel). Modelliert man die Polysulfidkette in einer HnSOR Untereinheit mit einer bereits ausgebildeten Tetrasulfidbrücke, wird die Schwefelkette ebenfalls in einer ähnlichen Orientierung in direkte räumliche Nähe zu der Schwefelbrücke angeordnet (Abb. 6.9 AaSOR vs. HnSOR, rechtes Panel). Insbesondere unter Berücksichtigung der vergleichbaren Ausrichtung der Cysteine in der Kryo-EM-Struktur der AaSOR (Vgl. Kap. 5.4, Abb. 5.20), scheint es somit denkbar, dass die CXXC-Motiv-Cysteine der SORs an einer Kettenpolymerisierung bzw. -depolymerisierung von Polysulfiden beteiligt sind. Dabei kommt es wahrscheinlich zu Thiol-Disulfid-Austauschen zwischen Substrat und den Thiolat-Anionen der Cystein-Reste. Einen Anhaltspunkt hierfür gaben MALDI-TOF-Analysen von AaSOR und TpSOR in ihrer nicht inkubierten Form und nach Inkubation mit elementarem Schwefel bei 85 bzw. 80°C für jeweils 1 min (Abb. 6.10). Die molekulare Masse der nativen Enzyme erhöhte sich dabei um 82 Masseinheiten für die AaSOR und sogar um 198 Masseinheiten für die TpSOR, was der Masse von 2,5 bzw. 6,2 Schwefelatomen entspricht.



**Abbildung 6.10** | MALDI-TOF-Analysen nativer AaSOR bzw. TpSOR und nach Inkubation mit elementarem Schwefel. Die Enzyme wurden in Enzymtestpuffer mit und ohne Schwefel bei ihrem jeweiligen pH-Optimum für 1 min inkubiert und anschließend in ein Eisbad überführt. MALDI-TOF-Analysen erfolgten mit einer DHAP-Matrix. x-Achse, Molekulargewicht [Da]

Auch wenn hierbei andere Enzymmodifikationen, wie bspw. Oxidationen, nicht ausgeschlossen werden können, scheint eine Schwefelmodifikation wahrscheinlich. Auch die exakte Position der Modifikation ist sehr spekulativ, wobei die konservierten Cysteine in der *active site pocket* in vielen Fällen zusätzliche Elektronendichten in Röntgenkristall-

und Kryo-EM-Strukturen aufwiesen, was eine Modifikation an diesen Stellen im Rahmen des Substratumsatzes grundsätzlich denkbar macht (s. Kap. 5 für Details). Unklar bleibt dennoch, inwiefern die Polysulfidkette direkt über das CXXC-Motiv mit dem Eisenzentrum interagiert oder ob zuvor eine Interaktion mit dem essentiellen Cys<sub>31/33</sub> vorliegen muss.

## Diskussion

Obwohl mittlerweile die Strukturen von vier SORs aufgeklärt und untersucht worden sind (Urich *et al.*, 2006, Li *et al.*, 2008, Veith *et al.*, 2011, Pöll, 2016 und Kap. 5), stellen sich jedoch weiterhin viele Fragen bezüglich der Substratbindung im aktiven Zentrum und den Substrat- und Produktwegen durch die großen, kugelförmigen Enzyme. In diesem Kapitel wurde eine umfassende, Software-gestützte Tunnel-, Kanal- und Bindungstaschenanalyse von drei verschiedenen SORs (*AaSOR*, *HnSOR* und *TpSOR*) durchgeführt. Diese zeigten generelle Unterschiede in der Kompaktheit der Enzyme zwischen solchen aus Thermophilen (*AaSOR*) und solchen aus Mesophilen (*HnSOR* und *TpSOR*). Während die *AaSOR* ein relativ dicht gepacktes Enzym darstellt, besitzen sowohl *TpSOR* und vor allem *HnSOR* eine Vielzahl verschiedener Tunnel und Kanäle ausgehend von der zentralen inneren Kavität mit vielen kleinen Hohlräumen in ihrer Proteinhülle (s. Abb. 6.2). Diese Kompaktheit äußert sich ebenfalls in den verschiedenen Schmelzpunkten der Enzyme, wobei die der *HnSOR* und *TpSOR* um ca. 20 °C im Vergleich zur *AaSOR* verringert sind (Vgl. Kap. 4; Abb. 4.5). Die erhöhte Anzahl von Tunneln und Kanälen könnte darüber hinaus auch die deutlich höheren Enzymaktivitäten im Vergleich zur *AaSOR* erklären, insbesondere bei niedrigen Reaktionstemperaturen (Veith *et al.*, 2012, Rühl *et al.*, 2017 und Kap. 4).

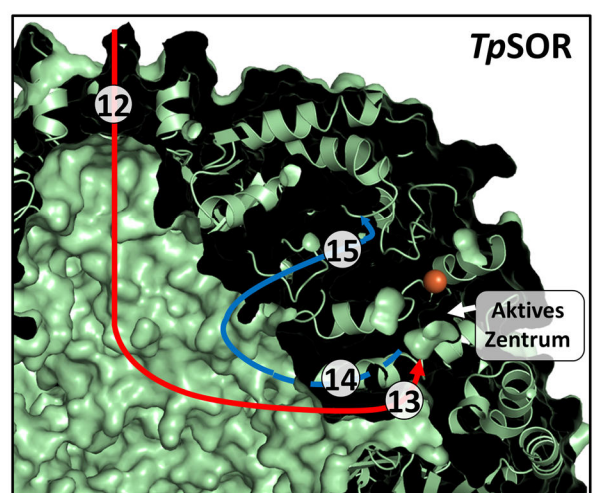
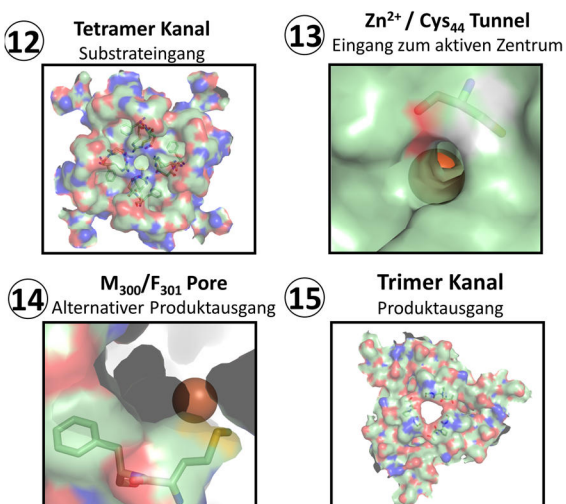
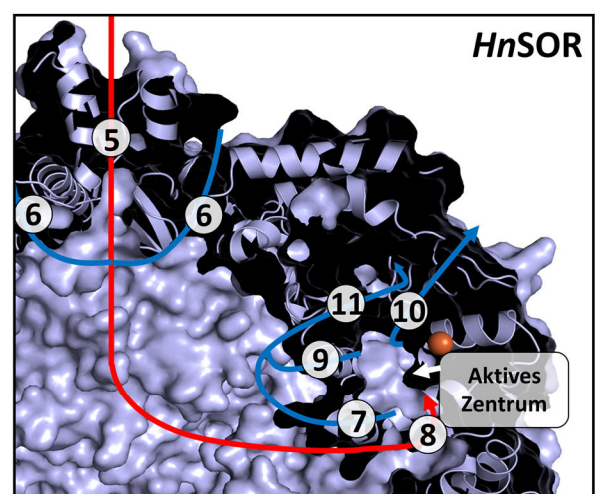
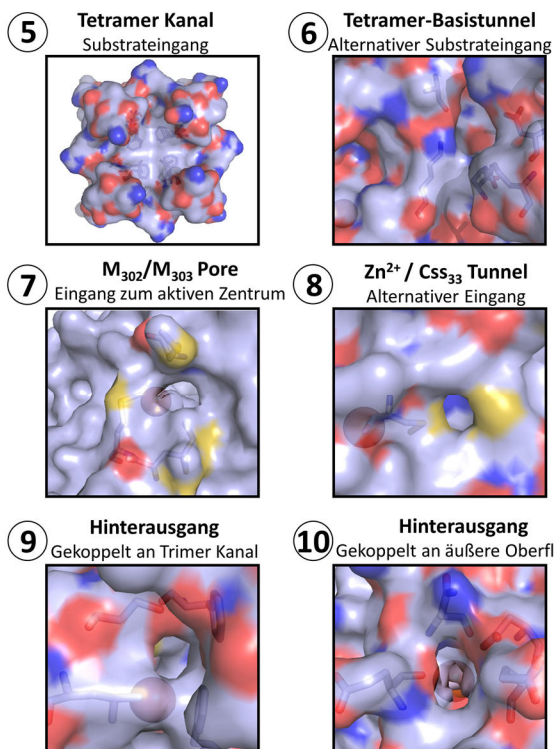
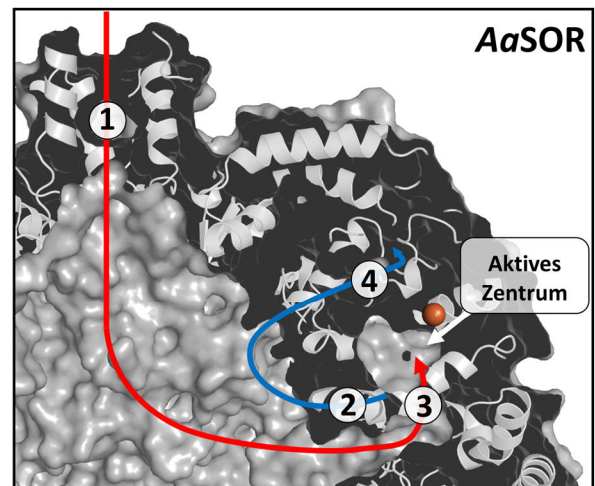
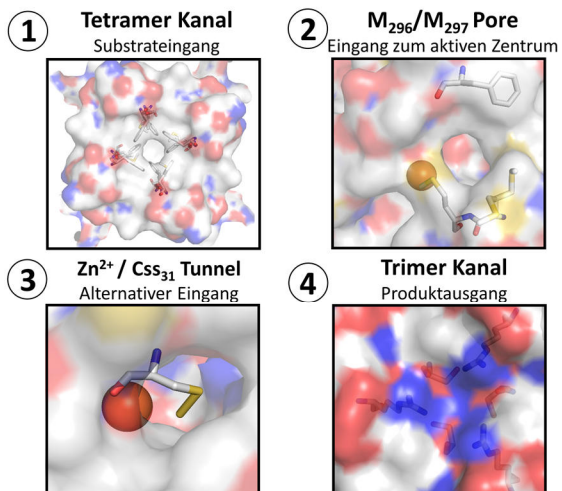
### Tetramer- und Trimerkanäle

Trotz der Komplexität der Tunnelnetzwerke haben alle drei SORs jedoch gemein, dass so genannte Tetramerkanäle an den Vier-

fachsymmetrieachsen vermutlich den Eingangspunkt des hydrophoben Schwefels in das Enzyminnere darstellen (Abb. 6.11; Kanal-/Tunnel-Nr. 1, 5, 12; *AaSOR*, *HnSOR*, *TpSOR*). Zwar bildet ein Ring aus vier Leucinen ( $L_{129}$ ) mit einem Porendurchmesser von 1,9 Å die engste Stelle des Kanals in der *HnSOR*, jedoch stellt insbesondere die äußere Region des Tetramerkanals einen kristallographisch flexiblen Bereich dar, sodass eine schnelle und reversible Kanalerweiterung, insbesondere bei hohen Reaktionstemperaturen, wahrscheinlich erscheint (s. Abb. 6.3). Die vergleichsweise hohe Polarität des Tetramerkanals der *TpSOR* könnte durch dessen deutliche Verkürzung kompensiert werden. In der *HnSOR* wurde zusätzlich ein weiterer Tunnel an der Basis des Tetramerkanals identifiziert („Tetramer-Basistunnel“; Abb. 6.11; Nr. 6). Der Durchmesser des Tunnels beträgt zwischen 3 und 4 Å, wobei sich die Engstelle insgesamt auf eine Distanz von über 20 Å erstreckt. Die engste Stelle befindet sich am Tunneleingang und besitzt einen Durchmesser von 2,6 Å. Nichtsdestotrotz ist der Tetramer-Basistunnel in der *HnSOR* deutlich länger als der Tetramerkanal und besitzt darüber hinaus eine hydrophilere Oberfläche (Polarität: 0,3 vs. 12,8), sodass ein Substrateingang in den inneren Hohlraum über den Tetramerkanal wahrscheinlicher erscheint und der Tetramer-Basistunnel eher einen Ausgang für hydrophile Reaktionsprodukte darstellen könnte.

Als weitere Produktausgänge dienen vermutlich die Trimerkanäle in allen drei SORs an den Dreifachsymmetrieachsen (s. Abb. 6.6). Bereits in vorangegangenen Analysen

**Abbildung 6.11 (folgende Seite) |** Überblick von allen relevanten Tunneln und Kanälen in *AaSOR* (1-4), *HnSOR* (5-11) und *TpSOR* (12-15). Mögliche Substratrouten sind in den Übersichten mit roten Pfeilen, Produktrouten mit blauen Pfeilen gekennzeichnet.





wurden die Trimerkanäle als mögliche Produktausgänge vorgeschlagen (Veith *et al.*, 2011). Trimerkanäle besitzen deutlich höhere Polaritäten als Tetramerkanäle (24,9 vs. 0,3) und sind damit die hydrophilsten aller identifizierten Kanäle in SORs, was eine Passage der gleichfalls hydrophilen SOR-Reaktionsprodukte wahrscheinlich macht ( $\text{H}_2\text{S}$  zumindest in seiner deprotonierten Form). In der *TpSOR* besitzt der Trimerkanal zwar eine geringere Polarität (s. Kap. 5, Abb. 5.11 für Details), ist jedoch deutlich weiter geöffnet, sodass auch eine Passage voluminöser Schwefelverbindungen problemlos möglich erscheint – ein Umstand der die im Vergleich zur *AaSOR* und *HnSOR* erhöhten Oxygenase-Aktivitäten erklären könnte (s. Kap. 4 für Details).

### Zugang zum aktiven Zentrum über den Zn/Css-Kanal

Die Identifizierung des Eingangs zum aktiven Zentrum ist weniger eindeutig im Vergleich zu den Substrat- und Produktwegen über den Tetramer- und Trimerkanal. Für die *AaSOR* wurde in ersten Analysen eine enge Pore identifiziert (Porendurchmesser 3-4 Å), die von zwei konservierten Methioninen ( $\text{M}_{296/297}$ ) und einem Phenylalanin ( $\text{F}_{23}$ ), zusammen mit einem Isoleucin ( $\text{I}_{47}$ ) gebildet wird (Veith *et al.*, 2011) (Abb. 6.11; Nr. 2). Analog zu den Beobachtungen in der *AaSOR* bilden in der *HnSOR* ebenfalls hauptsächlich hydrophobe Reste ( $\text{M}_{25}$ ,  $\text{M}_{302}$ ,  $\text{M}_{303}$ ) die Pore zum aktiven Zentrum (Pöll, 2016) (Abb. 6.11; Nr. 7). Im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit durchgeführten Tunnelanalysen zeigte sich jedoch, dass die Pore des Kanals zwar stark hydrophob ist, was eine Passage von Polysulfiden wahrscheinlich macht, jedoch die anschließende Tunneloberfläche eine lediglich moderate Hydrophobizität aufweist. Dementsprechend lässt sich keine endgültige Aussage über den Transport des hydrophoben Substrates oder der hydrophilen Reaktionsprodukte treffen. In der *TpSOR* ist jene Eingangspore darüber hinaus deutlich hydrophiler als in der *AaSOR* und der *HnSOR*. Diese

wird von einem Methionin ( $\text{M}_{300}$ ), einem Phenylalanin ( $\text{F}_{301}$ , in den drei phylogenetisch tief abzweigenden SORs, inklusive der *TpSOR*, ist das zweite der beiden konservierten Methionine gegen Phenylalanin ersetzt; s. Kap. 5 Abb. 5.1 für ein Sequenzalignment aller verfügbaren SOR-Sequenzen), zusammen mit einem Serin ( $\text{S}_{41}$ ) und zwei Argininen ( $\text{R}_{34}$ ,  $\text{R}_{37}$ ) gebildet, wobei letztere für den hydrophilen Charakter der Pore verantwortlich sind (Abb. 6.11; Nr. 14). Ein direkter Zugang über diese Pore erscheint in der *TpSOR* aufgrund des interhelikalen *loops* in Helix 3 zumindest im vorliegenden Zustand der 3D-Strukturen nicht möglich (s. Kap. 5 für Details).

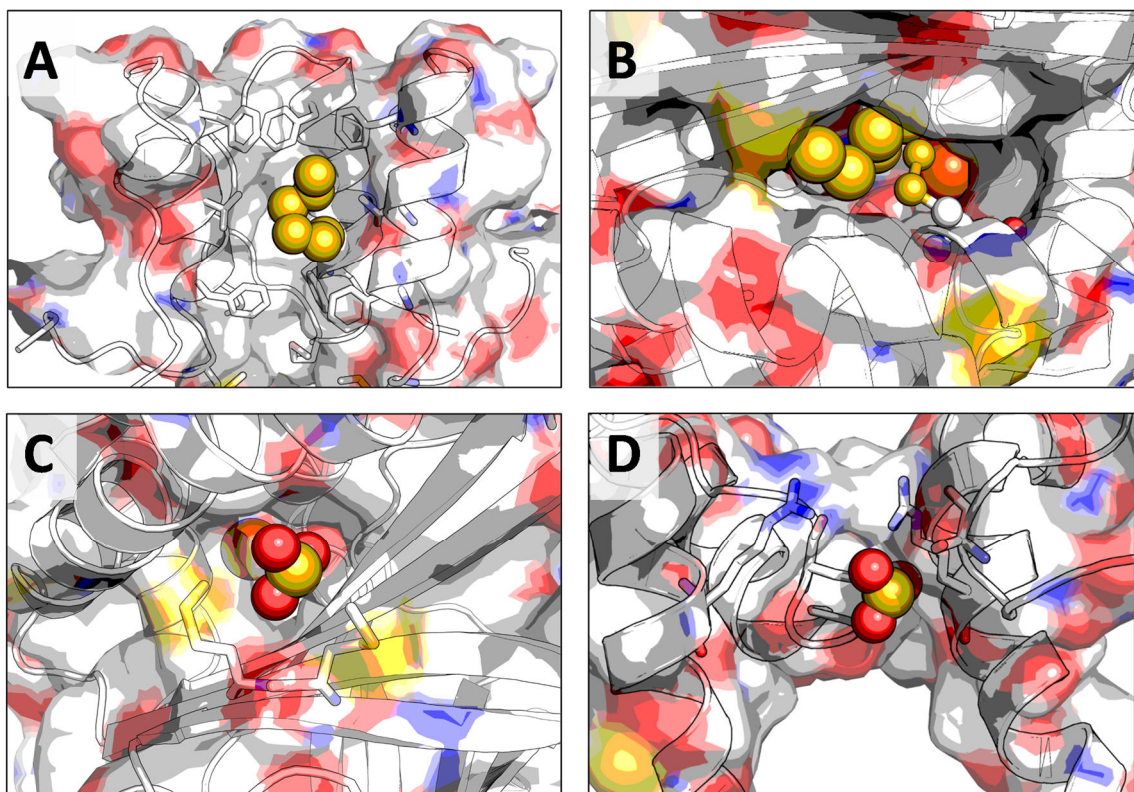
Interessanterweise wurde im Rahmen dieser Arbeit ein weiterer Tunnel identifiziert, der einen möglichen Zugang zum aktiven Zentrum darstellt (Abb. 6.11; Nr. 3, 8, 13). Der Zugang verläuft über den so genannten „Zink-Kanal“, der in einer vorangegangenen Studie identifiziert worden war (Veith *et al.*, 2011) (s. Abb. 6.5). Der Tunnel mündet in eine geräumige Tasche, an deren Ende sich zwei konservierte Histidine befinden. In Zink-inhibierten Röntgenkristallstrukturen der *AaSOR* wurde die Zinkbindung an diesen beiden Histidinen nachgewiesen, wobei auch die hier gezeigten Kryo-EM Strukturen der *AaSOR* und der *TpSOR* ohne vorherige Zink-Inkubation Elektronendichten an dieser Position zeigten, die auf Metallbindung zurückzuführen sein könnten (Veith *et al.*, 2011, s. Kap. 5 für Details). In den vorangegangenen Analysen des Zink-Kanals war jedoch keine direkte Verbindung mit dem aktiven Zentrum der *AaSOR* festgestellt und daher spekuliert worden, dass der inhibitorische Effekt aufgrund einer Störung der Substratbindung an das essentielle  $\text{Css}_{31}$  resultiert (Veith *et al.*, 2011). Auch in einer ersten Software-gestützten Analyse der *HnSOR*-3D-Struktur war bereits über eine Verbindung zwischen Zink-Kanal und dem aktiven Zentrum spekuliert worden und die Öffnung des Zugangskanals zum aktiven Zentrum von der Konformation von  $\text{M}_{303}$  abhängig gemacht (Pöll, 2016). Aus den in



der vorliegenden Arbeit durchgeführten Tunnelanalysen geht hervor, dass eine Verbindung des Zink-Kanals mit dem aktiven Zentrum über das essentielle C<sub>31/33/44</sub> in allen drei SORs vorhanden ist. Diese Beobachtungen könnten darauf hindeuten, dass das Substrat über den Zink-Kanal an die Cystein-Seitenkette bindet und von dort aus ins aktive Zentrum transferiert wird. Dies könnte auch erklären, warum das entsprechende Cystein in keine der bislang untersuchten SORs durch eine andere Aminosäure ohne kompletten Verlust der Enzymaktivität ersetzt werden konnte (Chen *et al.*, 2005, Urich *et al.*, 2005b und Kapitel 4). Es ist damit, ausgenommen der Eisenliganden, die einzige Aminosäure bei der eine Substitution einen derart drastischen Effekt besitzt.

### Modell der Substrat- und Produkttrouten in SORs

Vergleicht man die Tunnelnetzwerke der verschiedenen SORs im Detail fällt auf, dass die *HnSOR* nicht nur das komplexeste Tunnelnetzwerk bezogen auf das Holoenzym, sondern zusätzliche Tunnel/Kanäle besitzt, die das aktive Zentrum entweder mit dem inneren Hohlraum (Abb. 6.11; Nr. 9) oder sogar direkt mit der äußeren Proteinoberfläche (Abb. 6.11; Nr. 10) verbinden. Dieser Umstand macht eine allgemein gültige Aussage über Substrat- und Produkttrouten in SORs ungleich schwerer, da theoretisch mehrere dieser *pathways* genutzt werden können. Im Gegensatz zur *AaSOR* und *TpSOR* weist die *HnSOR* insgesamt mindestens acht verschiedene Tunnel auf, wobei einige dieser Tunnel Längen von bis zu 80 Å erreichen und dem-



**Abbildung 6.12** | Modell der in SORs allgemein gültigen Substrat- und Produkttrouten, exemplarisch dargestellt an der Röntgenkristallstruktur der *AaSOR*. **A**, Modellierte Polysulfidkette ( $n = 6$ ) in den Tetramerkanal mit Kanal-auskleidenden Aminosäuren. **B**, Modellierte Polysulfidkette ( $n = 5$ ) in den Zn/Css-Kanal mit essentiellen, persulfurierten C<sub>31</sub>. **C**, Modelliertes Sulfid an der postulierten M<sub>296</sub>/M<sub>297</sub>-Ausgangspore. **D**, Modelliertes Sulfid in den Trimerkanal mit Poren-bildenden Aminosäuren. Für die Darstellungen wurde die jeweilige Polysulfidkette bzw. Sulfid in die entsprechenden Kanäle/Poren modelliert und anschließend die gesamte Struktur energieminiert.

nach als eher unwahrscheinlichere Substrat- oder Produktrouten einzustufen sind. Dies deutet drauf hin, dass es insbesondere in der *AaSOR*, vermutlich aber auch in der *TpSOR* (die tatsächliche Anzahl an verschiedenen Tunneln ausgehend vom aktiven Zentrum konnte aufgrund der unterbrochenen Bindungstasche nicht ermittelt werden), ein im Vergleich zur *HnSOR* einfacheres Modell der Substrat- und Produktrouten aufgestellt werden kann und muss (Abb. 6.12). Entsprechend gelangt die unpolare Schwefelkette als Substrat vermutlich zunächst über die Tetramerkkanäle in den inneren Hohlraum und wird dort über den neu identifizierten Zn/Css-Kanal in das aktive Zentrum transferiert, während die Reaktionsprodukte vermutlich über die zuvor identifizierten Substrateingang das aktive Zentrum verlassen und wieder in den inneren Hohlraum gelangen. Von dort aus werden die Produkte über die polaren Trimerkanäle aus dem Enzym freigegeben. Generell kann diese Substrat- und Produkt-

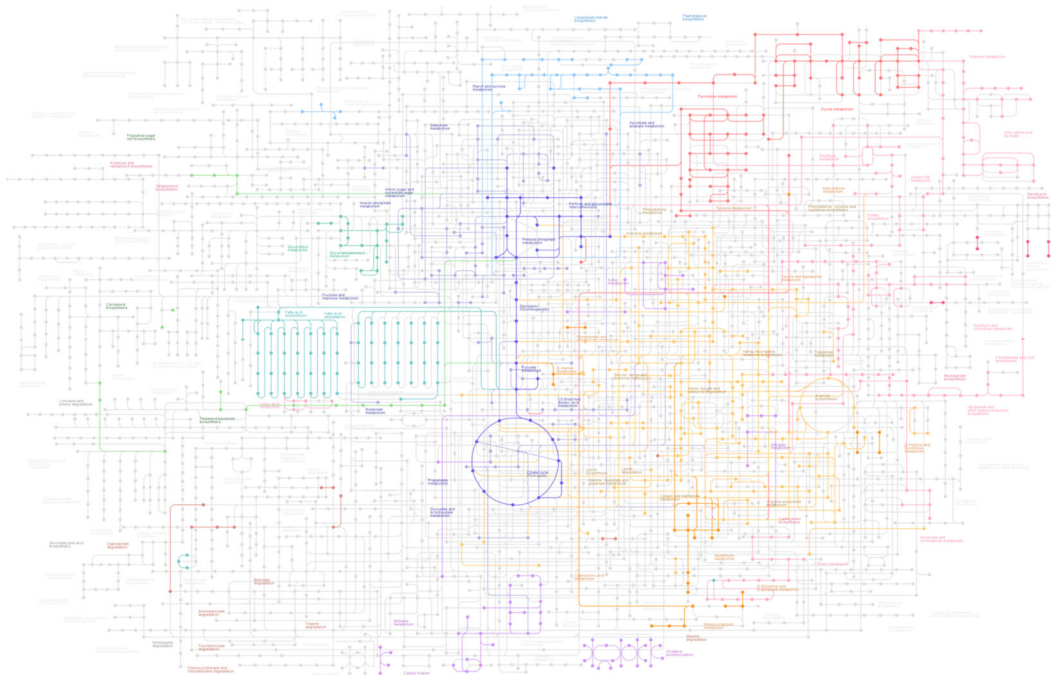
route ebenso auf die *HnSOR* übertragen werden, wobei die hier zusätzlichen Tunnel/Kanäle mehr Möglichkeiten, insbesondere für potentielle Produktrouten, bieten, da die Mehrheit der identifizierten zusätzlichen Tunnel in der *HnSOR* einen polaren Charakter besitzen. Die Wichtigkeit und die Rolle der einzelnen Tunnel/Kanäle konnte in der *HnSOR* allerdings bisher nicht mittels Mutagenese-Studien verifiziert werden, da sich die *HnSOR* als weniger robust gegenüber Substitutionen erwies (Pöll, 2016). Darüber hinaus kann  $\text{H}_2\text{S}$  in seiner protonierten Form gleichfalls hydrophob sein und somit ebenfalls die Tetramerkkanäle passieren, genauso wie Polysulfide in ihrer neutralen, protonierten Form nicht ausschließlich hydrophob sein müssen. Dementsprechend erscheint es möglich, dass unterschiedliche Kanäle, in Abhängigkeit des Protonierungsgrades, für unterschiedliche Substrat- und Produktwege genutzt werden können.

# KAPITEL 7

## Vergleichende RNA- und Proteom- analysen von *Tv. paradoxus*

---

Einblicke in den Schwefelmetabolismus eines mesophilen  
Schwefeloxidierers in Anwesenheit von Thiosulfat  
bzw. Thiocyanat als Energiequelle



## Einleitung

Sodaseen stellen eine besondere Art von salinen und alkalischen Seen dar, in denen gelöstes Natrium-Carbonat und /-Bicarbonat in hohen Konzentrationen vorkommt und damit ein stabiles alkalisches Milieu schafft. Sie sind weltweit verbreitet, kommen aber vor allem in ariden und semi-ariden Regionen wie dem *Rift Valley* in Ostafrika, den regenarmen Gegenden in Kalifornien und Nevada und der Kulunda-Steppe Südsibiriens vor (Sorokin *et al.*, 2014).

Durch das Carbonat/Bicarbonat-System besitzen solche Gewässer pH-Werte zwischen 9 und 11 bei Salzkonzentrationen bis 4,3 M Na<sup>+</sup> (Tindall, 1988, Grant *et al.*, 1999, Sorokin *et al.*, 2011). Um den hohen Salzkonzentrationen entgegenzuwirken bilden die meisten der dort lebenden Mikroorganismen cytoplasmatische *compatible solutes* als osmotischen Schutzmechanismus (Banciu *et al.*, 2005). Der Schwefelzyklus ist einer der wichtigsten biogeochemischen Prozesse in diesen Habitaten (Sorokin *et al.*, 2010, Sorokin *et al.*, 2011, Sorokin *et al.*, 2015) und wird von Sulfat-reduzierenden Deltaproteobacteria und *Firmicutes*, Schwefel-reduzierenden Bakterien und insbesondere durch Schwefel-oxidierende Gammaproteobacteria angetrieben (Sorokin *et al.*, 2013, Sorokin *et al.*, 2018). Die meisten Isolate aus solchen Habitaten stellen Gammaproteobacteria der Gattung *Thioalkalivibrio* dar (Sorokin *et al.*, 2006, Sorokin *et al.*, 2013).

In phylogenetischen Analysen stellte sich heraus, dass drei *Thioalkalivibrio* spp. ein *sor* Gen besitzen (Rühl *et al.*, 2017). Unter ihnen zweigen die SORs von *Tv. paradoxus* ARh 1 und *Tv. nitratireducens* tief im phylogenetischen Stammbaum der Proteinfamilie ab (s. Kap. 1.2.2, Abb. 1.4). Biochemische und strukturelle Untersuchungen des Enzyms aus *Tv. paradoxus* zeigten größtenteils SOR-typi-

sche Eigenschaften mit einer optimalen Enzymaktivität bei pH 9 und 80 °C (s. Kap. 4 für Details). *Tv. paradoxus* wurde aus einem Sodasee in Kenia isoliert und bildet große, nicht-bewegliche Stäbchen (Sorokin *et al.*, 2002). Der chemolithotrophe Organismus ist alkaliphil und moderat halophil und in der Lage mit Thiosulfat und Nitrat, aber auch mit Thiocyanat als einzige Energie-, Stickstoff- und Schwefelquelle zu wachsen. Auch die Oxidation von Sulfid, Polysulfid, Schwefel und Kohlenstoffdisulfid scheinen möglich (Sorokin *et al.*, 2002). Die optimale Wachstumstemperatur ist zwischen 35 und 37 °C bei pH 10 beschrieben (Berben *et al.*, 2015).

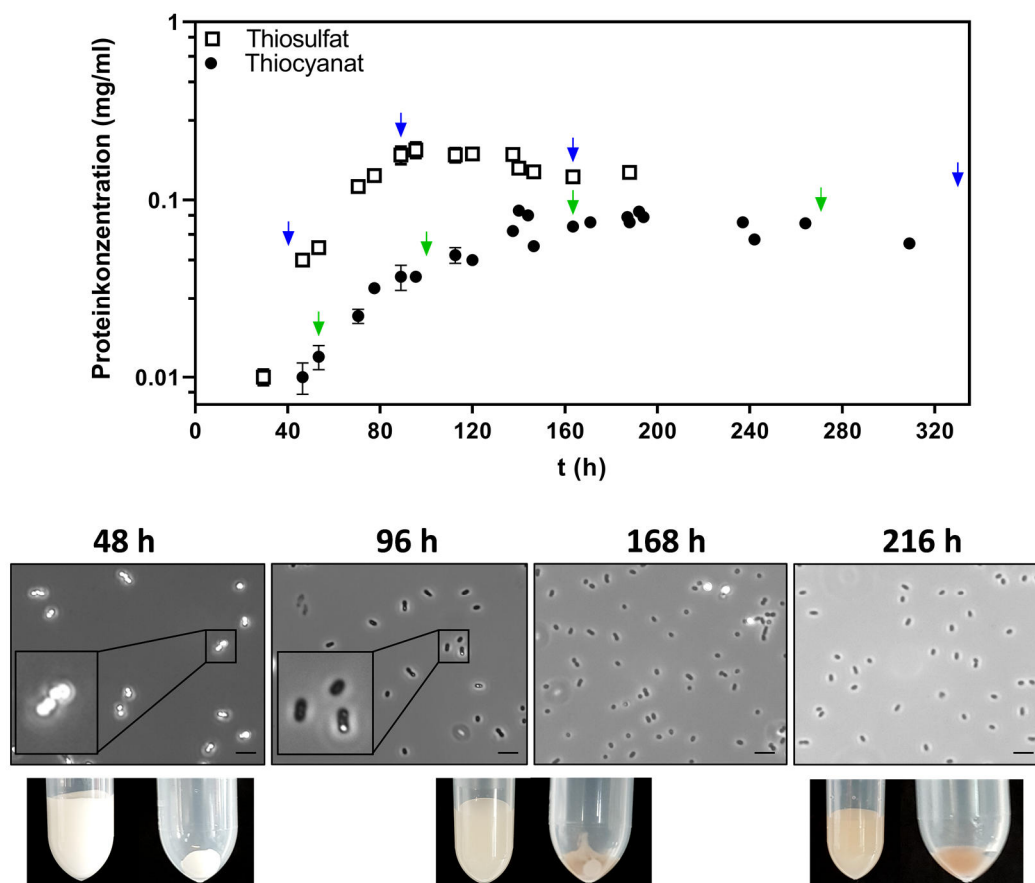
Während seines Wachstums produziert *Tv. paradoxus* Schwefelkugeln als Intermediat der Schwefeloxidation, unabhängig ob er mit Thiosulfat oder Thiocyanat kultiviert wurde (Sorokin *et al.*, 2002, Sorokin *et al.*, 2013). Der elementare Schwefel wird anschließend cytoplasmatisch nur langsam zu Sulfat oxidiert, wobei die SOR das initiale Enzym dieser Schwefeloxidation darstellen könnte (s. Kap. 1.3, Abb. 1.11). Aufgrund des *TpSOR*-Aktivitätsoptimums bei 80 °C stellt sich jedoch die Frage, inwiefern das *sor* Gen bei Wachstumstemperaturen von 30 - 37 °C exprimiert bzw. das entsprechende Protein gebildet wird. Um dies zu überprüfen sollte in dieser Arbeit zunächst die Expression des *sor* Gens, zusammen mit denen anderer am Schwefelmetabolismus beteiligter Gene, überprüft werden. In einer globalen Proteomstudie sollten darüber hinaus Proteine, die an der Schwefeloxidation in *Tv. paradoxus* beteiligt sind, identifiziert und in den dissimilatorischen Schwefelmetabolismus eingeordnet werden. Zudem sollten Unterschiede in Abhängigkeit der Energiequelle für autotrophes Wachstums (Thiosulfat vs. Thiocyanat) festgestellt werden.

## Ergebnisse

### 7.1 Wachstumsparameter und Schwefeleinlagerung

*Tv. Paradoxus* ARh1 wurde aerob in mineralischen Basismedium bei pH 10 mit Thiosulfat und Nitrat bzw. mit Thiocyanat als Energiequelle bei 30 °C kultiviert. Die Reduzierung der Kultivierungstemperatur auf 20 °C oder die Erhöhung auf 37 °C resultierte in einer Verlangsamung des Wachstums gegenüber den Standardkultivierungsbedingungen. Wurden Formiat, Acetat, Pyruvat oder Was-

serstoff als Elektronendonoren genutzt, war innerhalb von acht Wochen kein Zellwachstums sichtbar, sowohl unter aeroben als auch unter anaeroben Bedingungen mit Nitrat als Elektronenakzeptor. Aufgrund von enzymatischer Schwefelbildung innerhalb der ersten vier Stunden der Kultivierung war, unabhängig von der Wahl der Schwefelquelle, keine Bestimmung der optischen Dichte der Zellkultur möglich. Die Schwefelbildung trat bei Sterilkontrollen nicht auf. Entsprechend wurden die Zellen für die Bestimmung der Wachs-

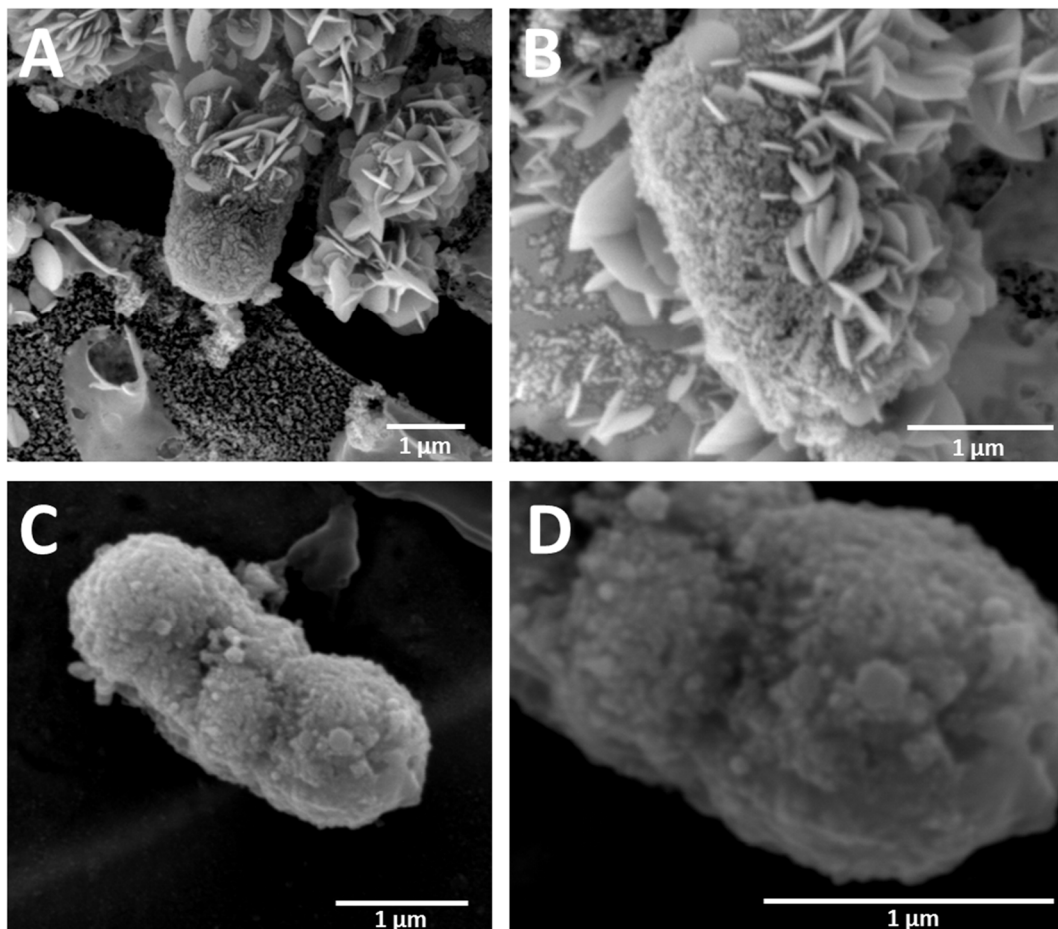


**Abbildung 7.1** | Wachstumskurven und lichtmikroskopische Aufnahmen von *Tv. paradoxus*. **A**, Wachstumskurven mit Thiosulfat bzw. Thiocyanat als Elektronendonoren. Die Wachstumskurven wurden erstellt, indem Zellen sonographisch aufgeschossen und anschließend der Proteingehalt ermittelt wurde. Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung aus drei unabhängigen Zellkulturen mit jeweils drei Messungen. Pfeile zeigen die Zeitpunkte der Probenentnahme für qRT-PCR-Analysen (blau: Thiosulfat; grün: Thiocyanat). **B**, Exemplarische Darstellung lichtmikroskopischer Aufnahmen der Kultivierung von *Tv. paradoxus* mit Thiosulfat als Elektronendonor nach vier verschiedenen Wachstumszeitpunkten (obere Reihe). *Insets*, Vergrößerungen von Zellen mit lichtbrechenden Schwefelkugeln. Untere Reihe: Färbungen von Kulturen und Zellsedimenten der jeweiligen Kultivierungszustände. Maßstabsbalken entspricht 5 µm.

tumskurven sonographisch aufgeschlüsselt und basierend auf den Proteingehältern der Kulturen erstellt. Hierbei ergab sich für das Wachstum mit Thiosulfat und Nitrat eine exponentielle Wachstumsphase innerhalb der ersten  $\approx 100$  h (Abb. 7.1 A), mit einer Ratenkonstante  $k = 0,09$ , einer Zeitkonstante  $\tau = 10,6$  und einer Verdopplungszeit von  $7,4$  h. Wurde Thiocyanat als Energiequelle verwendet, resultierte dies in geringeren Zelldichten, bei einer exponentiellen Wachstumsphase innerhalb von  $\approx 160$  h (Abb. 7.1 A), mit  $k = 0,05$ ,  $\tau = 21,5$  und einer Verdopplungszeit von  $14,9$  h. In lichtmikroskopischen Aufnahmen waren zellassoziierte, lichtbrechende Strukturen während der exponentiellen Wachstumsphase sichtbar (Abb. 7.1 B). Dies ist vermutlich das Resultat der intrazel-

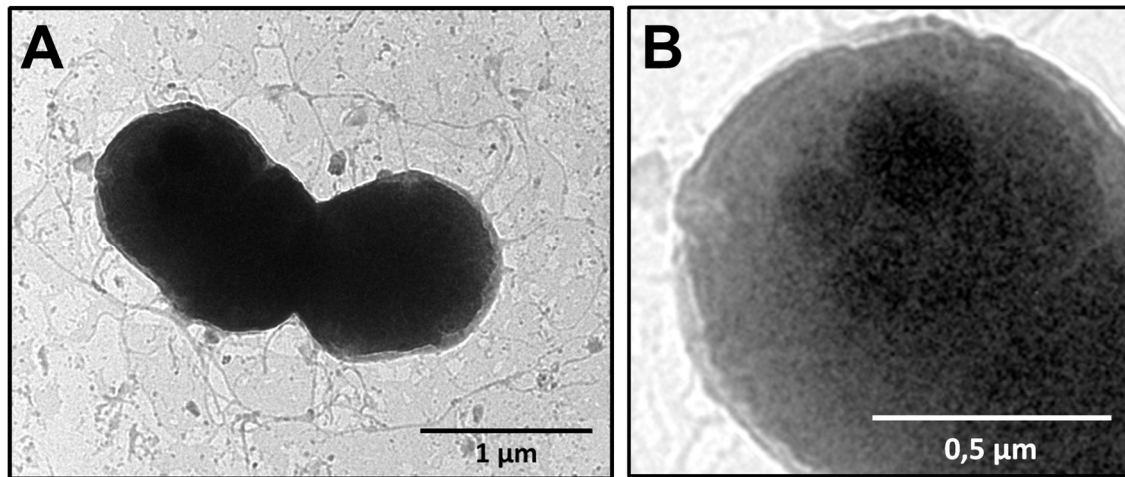
lulären Einlagerung großer Mengen elementaren Schwefels, wie es bereits für *Tv. paradoxus* beschrieben wurde (Sorokin *et al.*, 2002). Mit fortschreitender Kultivierungsdauer verschwanden die lichtbrechenden Strukturen wieder. Ebenso änderte die Kultur, unabhängig davon ob Thiosulfat oder Thiocyanat als Energiequelle genutzt wurde, ihre charakteristische Färbung während der Kultivierung von einem undurchsichtigen Weiß zu einer rötlichen Farbe, was auf die Bildung von c-Typ Cytochromen in späteren Wachstumsphasen schließen lässt. Die weißliche Färbung korreliert dabei mit dem mikroskopischen Auftreten von Schwefelkugeln (Abb. 7.1)

SEM-Analysen zeigten, dass sich *Tv. paradoxus* Zellen während exponentieller Wachstumsphasen in großen Schwefelakkumulatio-



**Abbildung 7.2** | SEM-Aufnahmen von *Tv. paradoxus*. **A**, *Tv. paradoxus* Zelle eingebettet in Schwefelakkumulationen nach 100 h Kultivierung mit Thiosulfat als Elektronendonator. **B**, Schwefelakkumulationen durch *Tv. paradoxus* kultiviert mit Thiocyanat für 130 h. **C**, *Tv. paradoxus* Zelle nach 260 h Kultivierung mit Thiosulfat. **D**, Vergrößerung von C mit deutlich sichtbaren Oberflächenstrukturen.





**Abbildung 7.3** | TEM-Aufnahmen von *Tv. paradoxus*. **A**, *Tv. paradoxus* Zellen gewachsen mit Thiosulfat als Elektronendonator, nach 94 h Kultivierung. Dargestellt sind zwei Zellen mit sichtbaren, polaren Zellanhängseln. **B**, Vergrößerte Darstellung von einer *Tv. paradoxus* Zelle mit kontrastverstärkten intrazellulären Bereichen.

nen einbetten, die bereits optisch das Aussehen von Schwefelkristallen hatten (Abb. 7.2 AB). Mittels energiedispersiver Röntgenspektroskopie (EDX) wurde bestätigt, dass es sich hierbei um Schwefelverbindungen handelt (nicht gezeigt). In stationären Wachstumsphasen verschwanden diese Akkumulationen, wobei weiterhin Zelloberflächenstrukturen sichtbar blieben (Abb. 7.2 CD). EDX-Analysen zeigten, dass weiterhin eine Vielzahl Schwefelverbindungen zellassoziiert vorkommen (Kohlenstoff zu Schwefel Verhältnis, 1:1), wobei jedoch nicht geklärt werden konnte, ob es sich hierbei um die sichtbaren Oberflächenstrukturen oder intrazelluläre Schwefelverbindungen handelt.

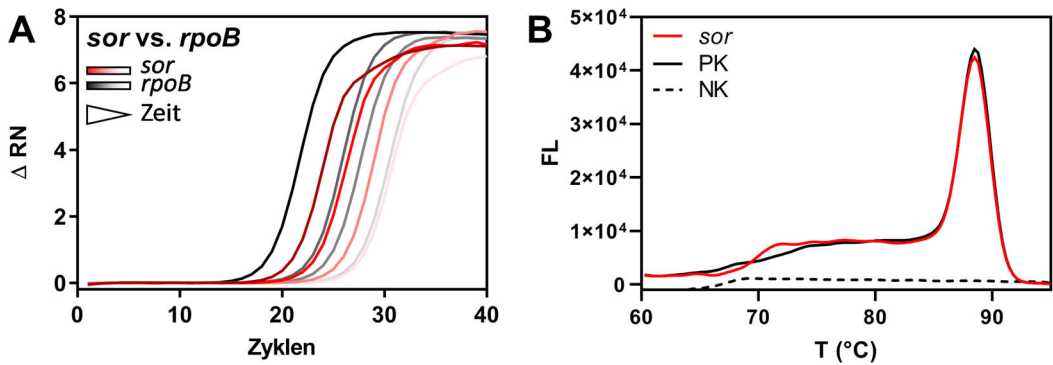
Wurden *Tv. paradoxus* Zellen in der spätexponentiellen Wachstumsphase mittels TEM analysiert, waren polare Zellanhängsel vorhanden, wobei es sich vermutlich um Piline handelt. Außerdem waren in einigen Zellen intrazelluläre Bereiche mit einer höheren Elektronendichte sichtbar (Abb. 7.3). Dies könnte ein Resultat der intrazellulären Schwefeleinlagerung sein (Sorokin *et al.*, 2002). Es ist jedoch nicht auszuschließen, dass es sich dabei ebenfalls um Carboxysomen oder intrazelluläre Speicherstoffe handeln könnte.

## 7.2 Transkriptionsanalysen

Um die Rolle von Proteingenen mit einer vorhergesagten Funktion im Schwefelmetabolismus zu verstehen, wurden die Transkriptstärken der folgenden Gene mittels quantitativer Reverser-Transkriptase PCR (qRT-PCR) in Abhängigkeit vom Elektronendonator Thiosulfat oder Thiocyanat bestimmt: der Schwefel Oxygenase Reduktase (*sor*), der A-Untereinheit des Schwefel Oxidationskomplexes (*soxA*), der Persulfid Dioxygenase (*pdo*), der A-Untereinheit des Sulfit-oxidierenden Enzyms (*soeA*), der dissimilatorischen Sulfit Reduktase A (*dsrA*) und der Thiocyanat Dehydrogenase (*tcdH*). Hierfür wurde zunächst gereinigte RNA von Zellen verschiedener Wachstumsphasen (Abb. 7.1) in cDNA transkribiert und diese als *template* für die qRT-PCR-Analysen verwendet. Die Spezifität der PCR-Produkte wurde einerseits mittels Polyacrylamid-Gelelektrophorese für kleine Nukleinsäuren mit einer Positivkontrolle aus genomischer DNA und andererseits anhand des Vergleiches der Schmelzpunkte direkt aus dem qRT-PCR-Ansatz überprüft (Abb. 7.4). Für die qRT-PCR-Analysen diente das Haushaltsgen der  $\beta$ -Untereinheit der bakteriellen

**Tabelle 7.1** |  $\Delta$  CT-Werte des *sor* und *rpoB* Gens nach Kultivierung von *Tv. paradoxus* mit Thiosulfat. Dargestellt sind die Mittelwerte aus sechs unabhängigen Messungen.

		42 h	96 h	162 h	330 h
$\Delta$ CT	<i>sor</i>	26,0 $\pm$ 0,8	27,0 $\pm$ 0,9	28,5 $\pm$ 1,1	27,9 $\pm$ 0,8
	<i>rpoB</i>	24,4 $\pm$ 0,5	26,9 $\pm$ 0,6	29,0 $\pm$ 0,7	27,8 $\pm$ 0,7



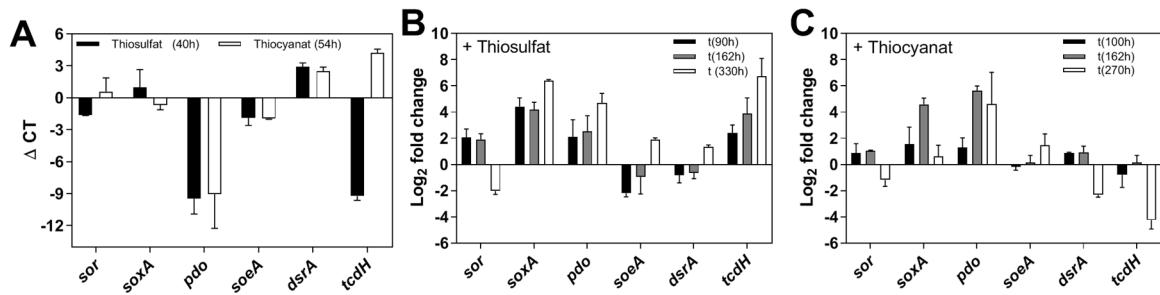
**Abbildung 7.4** | Darstellung quantitativer RT-PCR Analysen des *sor* Gens. **A**, Exemplarische Darstellung von Amplifikationsgraphen des *sor* Gens und des *rpoB* Haushaltsgens zur Normalisierung der Daten zu verschiedenen Zeitpunkten, ausgehend von 3  $\mu$ g eingesetzter RNA für die cDNA-Synthese (siehe Anhang, Abb. S-7.1 für weitere Amplifikationsgraphen). **B**, Schmelzkurven der qRT-PCR Reaktionsprodukte des *sor*-Amplifikats zur Kontrolle der Produktspezifität. Als Positivkontrolle (PK) wurde genomische *Tv. paradoxus* DNA verwendet. Als Negativkontrolle (NK) diente ein Ansatz, in dem die DNA durch ddH<sub>2</sub>O ersetzt wurde.

RNA-Polymerase (*rpoB*) als Quantifizierungsstandard.

Am Beispiel des *sor* Gens sieht man mit *rpoB* vergleichbare Expressionslevel (Tab. 7.1), wobei das qRT-PCR-Produkt anhand seiner Schmelzkurve und dem Vergleich zur Positivkontrolle als spezifisch angesehen werden kann (Abb. 7.4). Betrachtet man den zeitlichen Verlauf der *sor* Expression wird deutlich, dass Transkripte in den exponentiellen und frühstationären Wachstumsphasen in hohen Mengen gebildet werden und die Expression in stationären Wachstumsphasen abnimmt, unabhängig davon, ob Thiosulfat oder Thiocyanat als Elektronendonoren genutzt wurden (Abb. 7.5). Dies korreliert mit den mikroskopischen Beobachtungen des Vorkommens von intrazellulären Schwefelkugeln und deutet darauf hin, dass die SOR eine wichtige Rolle in der Schwefeloxidation von *Tv. paradoxus* einnimmt.

Mit Ausnahme des *pdo* Gens, welches nur sehr geringe Transkriptmengen aufwies, wurden Transkripte der weiteren untersuchten

Gene des Schwefelmetabolismus in hoher Konzentration über die gesamte Wachstumsperiode gebildet (Abb. 7.5). Insbesondere *soxA* und *dsrA* Transkripte waren bereits nach 40 bzw. 54 h in vergleichbaren bzw. höheren Mengen als *rpoB* vorhanden, unabhängig von der Schwefelquelle. Die Nutzung von Thiosulfat als Energiequelle resultierte in einem 16- bis 64-fachen Anstieg der Transkriptmengen von *soxA* bzw. *dsrA* über die gesamte Kultivierungsdauer von 330 h, bezogen auf die Transkriptmengen nach 42 h. Betrachtet über den Kultivierungsverlauf nahmen die *dsrA* mRNA-Konzentrationen ab. Die beobachteten hohen *fold changes* des *pdo* Gens resultieren dagegen aus den geringen Abundanzen des entsprechenden Transkriptes nach 40 bzw. 54 h. Wie zu erwarten, gab es eine große Diskrepanz in der Expression des *tcdH* Gens, abhängig von der Wahl von Thiocyanat oder Thiosulfat als Elektronendonator, da das entsprechende Protein direkt am Thiocyanat-Metabolismus beteiligt ist. In Anwesenheit von Thiocyanat war die Abundanz anfangs um das  $\approx 10\,000$ -fache



**Abbildung 7.5** | qRT-PCR Analysen von Genen des dissimilatorischen, oxidativen Schwefelmetabolismus von *Tv. paradoxus*. **A**,  $\Delta C_T$ -Werte zum ersten Zeitpunkt der Probenentnahme nach 40 h (Thiosulfat) bzw. 54 h (Thiocyanat), normalisiert auf *rpoB* ([jeweiliges Gen] – [*rpoB*]). **B**, **C**, *Fold Changes* gegenüber den Werten aus Panel A mit Thiosulfat (B) bzw. Thiocyanat (C) als Elektronen-/Energiequelle. Analysen wurden von biologischen Duplikaten mit jeweils drei Messungen durchgeführt. *sor*, Schwefel Oxygenase Reduktase; *soxA*, Schwefeloxidiationskomplex A; *pdo*, Persulfid Dioxygenase; *soeA*, Sulfid-oxidierendes Enzym A; *dsrA*, Dissimilatorische Sulfid Reduktase A; *tcdH*, Thiocyanat Dehydrogenase.

höher verglichen mit Thiosulfat (theoretischer Wert unter der Annahme, dass sich mit jedem  $\Delta C_T$  die Transkriptmenge verdoppelt; Abb. 7.5 A), wobei es mit zunehmender Kultivierungsdauer zu einer Herabregulation des *tcdH* Gens kam, resultierend aus dem Verbrauch des Thiocyanats mit zunehmender Kultivierungsdauer. In Gegenwart von Thiosulfat wurde das Gen zwar im Lauf der Wachstumsphase hochreguliert, wies jedoch nach 40 h nur sehr geringe Transkriptmengen auf (Abb. 7.5)

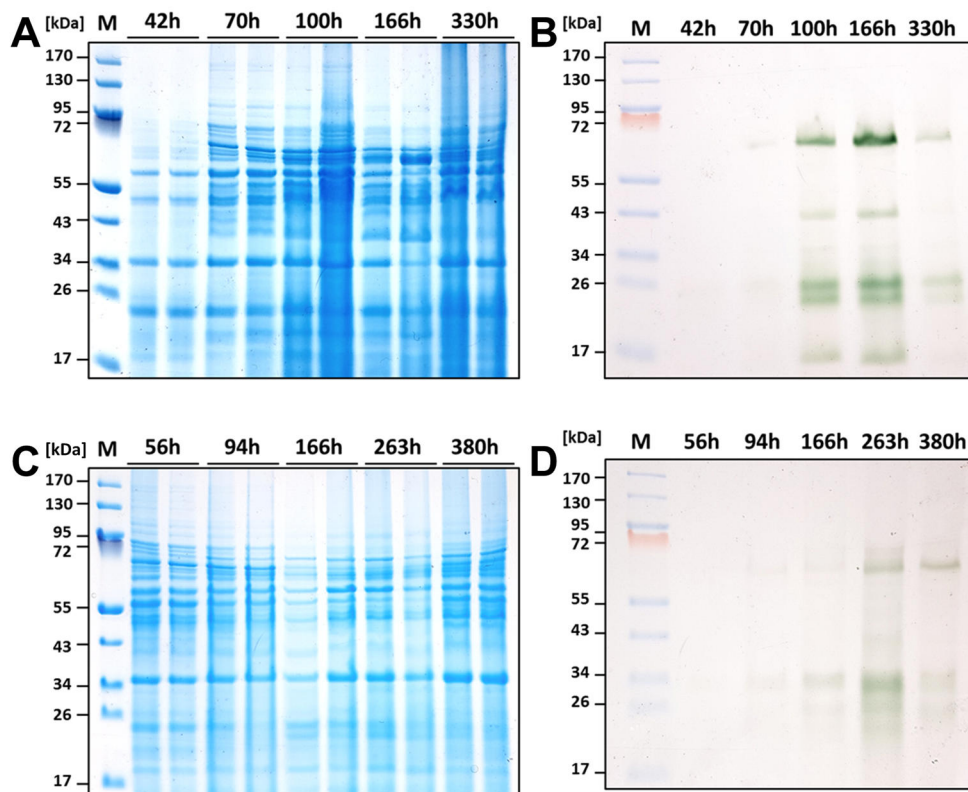
Insgesamt lässt sich feststellen, dass einige der Gene, die am Schwefelmetabolismus beteiligt sind, in vergleichbaren Mengen wie das Haushaltsgen *rpoB* exprimiert werden. Vor allem die Expression des *sor* Gens gibt einen klaren Hinweis darauf, dass die SOR an der chemolithotrophen Schwefeloxidation in *Tv. paradoxus* auch bei Temperaturen von 30 °C beteiligt sein sollte, obwohl das Enzym ein Temperaturoptimum von 80 °C besitzt (Rühl *et al.*, 2017 und Kapitel 4).

### 7.3 Proteomanalysen

#### SDS-Gelelektrophorese

Um zu überprüfen wie sich die Vorkommen von Proteinen zu verschiedenen Wachstumsstadien innerhalb der Kultivierung mit Thiosulfat und Thiocyanat ändert und ob

diese mit den RNA-Analysen aus *Tv. paradoxus* übereinstimmen, wurden Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten der Wachstumskurve sedimentiert, sonographisch aufgeschlossen und zunächst mittels SDS-PAGE analysiert (Abb. 7.6). Die mit kolloidaler Coomassie-Lösung gefärbten SDS-Gele zeigten spezifische Proteinmuster sowohl zu verschiedenen Kultivierungszeitpunkten, als auch im direkten Vergleich der Kulturen, die mit Thiosulfat bzw. Thiocyanat als Energiequelle gewachsen sind (Abb. 7.6 AC). Bei Kultivierung mit Thiosulfat traten nach 70 h deutlich ausgeprägte Proteinmuster zwischen 40 und 60 kDa und mit molekularen Massen von > 130 kDa auf. Eine charakteristische Proteinbande bei  $\approx$  55 kDa war im Vergleich zur Kultivierungsdauer von 42 h mit Thiosulfat als Elektronendonator vorhanden (Abb. 7.6 A). Im Verlauf der Kultivierung verschwanden die Proteinbanden mit molekularen Massen zwischen 40 und 50 kDa wieder. Ebenso kam es zu einem Rückgang der Banden mit hohen molekularen Massen ab 166 h. Wurde *Tv. paradoxus* mit Thiocyanat kultiviert waren ebenfalls Banden mit molekularen Massen von > 72 kDa in frühexponentiellen Wachstumsphasen nach 56 h in Coomassie-gefärbten SDS-Gele sichtbar, die ab 94 h schrittweise verblassten und schließlich verschwanden (Abb. 7.6 C). Im Gegensatz dazu kam es nach 166 h in spätexponen-



**Abbildung 7.6** | Polyacrylamidgels von mit Thiosulfat bzw. mit Thiocyanat gewachsenen *Tv. paradoxus* Gesamtextrakten **A, B**, Coomassie- (A) und Häm-gefärbte (B) Polyacrylamidgels von *Tv. paradoxus* Gesamtextrakten nach verschiedenen Kultivierungszeitpunkten mit Thiosulfat, und Panel **C**, und **D**, entsprechend mit Thiocyanat als Elektronendonoren. Auftragung für Coomassie-gefärbte Gels jeweils 25 µg, für Häm-gefärbte Gels 120 µg. M, Marker mit molekularen Massen in Kilodalton (kDa).

tiellen Wachstumsphasen zum Auftreten von einer charakteristischen Bande mit einer molekularen Masse von  $\approx 20$  kDa. Zusammengefasst ergaben die SDS-Gele erste Hinweise auf globale molekulare Änderungen im Proteinhinmuster und damit im Stoffwechsel von *Tv. paradoxus*, sowohl zu verschiedenen Kultivierungszeitpunkten als auch im direkten Vergleich der beiden Energiequellen.

Häm-Färbungen zeigten das wachstumsphasenabhängige Auftreten von bakteriellen Cytochromen *c* sowohl in Anwesenheit von Thiosulfat als auch mit Thiocyanat als Energiequelle (Abb. 7.6 BD). Bei Kultivierung mit Thiosulfat als Elektronendonator waren Cytochrome *c* bereits in geringen Mengen nach 70 h sichtbar (Abb. 7.6 B). Diese nahmen mit fortlaufender Kultivierung in den spätexponentiellen bzw. frühstationären Wachstumsphasen zu, wobei in spätstationären Wachstumsphasen wiederum weniger Cytochrome *c*

gebildet wurden. Manuelle Vergleiche mit Cytochromen *c* aus dem Gesamtproteom von *Tv. paradoxus* (basierend auf typischen Häm-Bindemotiven) legten nahe, dass es sich bei der Häm-Proteinbande bei  $\approx 62$  kDa höchstwahrscheinlich um eine Nitrit-Reduktase (UniProt ID: W0DM90) handelt, wobei die molekulare Masse von  $\approx 36$  kDa einer Cytochrom *c* Peroxidase (W0DFY7) entsprechen könnte. Für die Banden bei  $\approx 43$ , 25, 23 und 15 kDa konnten keine Cytochrome *c* eindeutig zugeordnet werden. Ein ähnliches Muster ergab sich nach Kultivierung mit Thiocyanat, wenngleich die Bildung von Cytochrom *c* Proteinen geringer ausgeprägt war als mit Thiosulfat (Abb. 7.6 D). Auch hier entspricht die, im Vergleich zur Kultivierung mit Thiosulfat deutlich schwächer ausgeprägte, Häm-Proteinbande bei 62 kDa höchstwahrscheinlich derselben Nitrit-Reduktase (W0DM90), wobei Banden mit niedrigerem Molekulargewicht von  $\approx 31$  bzw.

24 kDa nach Vergleichen mit dem Gesamtproteom aus *Tv. paradoxus* möglicherweise den Schwefel-Oxidationskomplex-Proteinen SoxA (W0DK9) und SoxX (W0DG82) zugeordnet werden können. Die Muster der Cytochrom *c* Proteine in der Häm-Färbung korrelieren dabei mit optischen Beobachtungen der Kultur, die in frühen Kultivierungsstadien aufgrund von Schwefelbildungen und -einlagerungen weißlich erscheinen und mit zunehmender Kultivierungsdauer eine rötliche Färbung annehmen (vgl. Abb. 7.1 B).

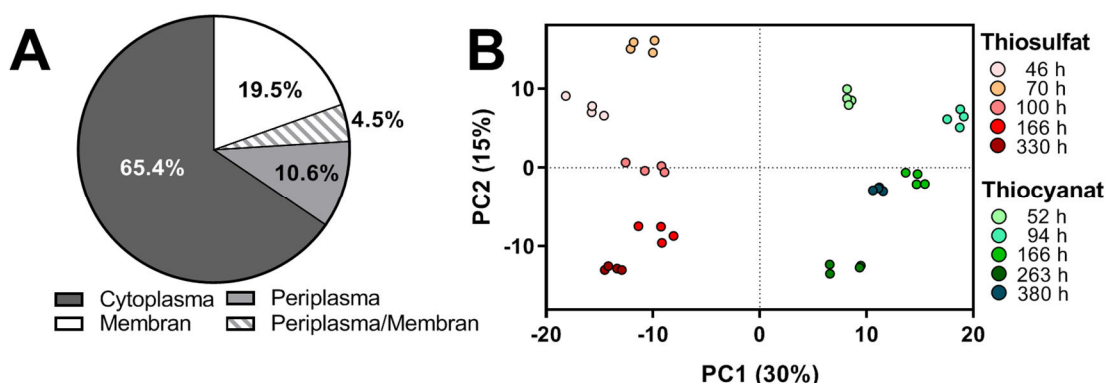
### SWATH-LC-MS/MS-Analysen

Aufgrund der deutlichen Unterschiede der Proteinmuster von mit Thiosulfat bzw. Thiocyanat gewachsenen *Tv. paradoxus* Kulturen auf Polyacrylamidgelen wurden vergleichende *label*-freie Proteomanalysen mittels SWATH-LC-MS/MS durchgeführt. Um eine projektspezifische Spektrenbibliothek zu erstellen, wurden die biologischen Replikate (alle Kultivierungszeitpunkte, unabhängig von der Wahl der Energiequelle) zunächst vereinigt, Trypsin-gespalten und die Gesamtheit aller nachweisbaren Proteine identifiziert. In dieser bisher einzigen Proteomanalyse eines Bakteriums der Gattung *Thioalkalivibrio* wurden insgesamt 1 951 von insgesamt 3 450 Proteinen identifiziert, basierend

auf Proteinannotationen der UniProt Datenbank. Dies entspricht einer Proteomabdeckung von 56,6 % bei einer Falscherkennungsrate von 1 %. Hiervon ausgehend war die Quantifizierung von 1 680 Proteinen möglich, was 86,1 % aller qualitativ nachgewiesenen Proteine des *Tv. paradoxus* Proteoms entspricht.

Eine Analyse der Aminosäuresequenzen der 1 951 qualitativ nachgewiesenen Proteine mittels der TMHMM- (v. 2,0; Krogh *et al.* (2001)) und SignalP-5.0-Server (Almagro Armenteros *et al.*, 2019) ergab, dass 65,4 % cytoplasmatisch und 19,5 % membrangebunden sind. 10,6 % der Proteine besitzen ein Signalpeptid für den Transport in das Periplasma, wobei weitere 4,5 % sowohl eine Signalsequenz als auch eine oder mehrere, zusätzliche Transmembranhelices besitzen (Abb. 7.7 A).

Eine Hauptkomponentenanalyse des *Tv. paradoxus* ARh1 Proteoms (*principal component analysis*, PCA) wurde zur Bestimmung des Grades der Abweichung zwischen technischen und biologischen Replikaten, aber auch für Vergleiche zwischen der Kultivierung mit Thiosulfat/Thiocyanat als Energiequelle durchgeführt. Die PC Analyse basiert auf den beiden größten Komponenten PC1 und PC2, die zusammengekommen einem Anteil von



**Abbildung 7.7 |** Statistische Analyse der zellulären Proteinverteilung und Evaluierung der Proteomdaten mittels globaler Hauptkomponentenanalyse. **A**, Bioinformatische Lokalisationsvorhersage basierend auf Berechnungen mit TMHMM und SignalP. Periplasma/Membran: Proteine mit Signalsequenz und Transmembranhelices. **B**, Hauptkomponentenanalyse der biologischen und technischen Duplikate zu verschiedenen Kultivierungszeitpunkten mit unterschiedlichen Energiequellen.

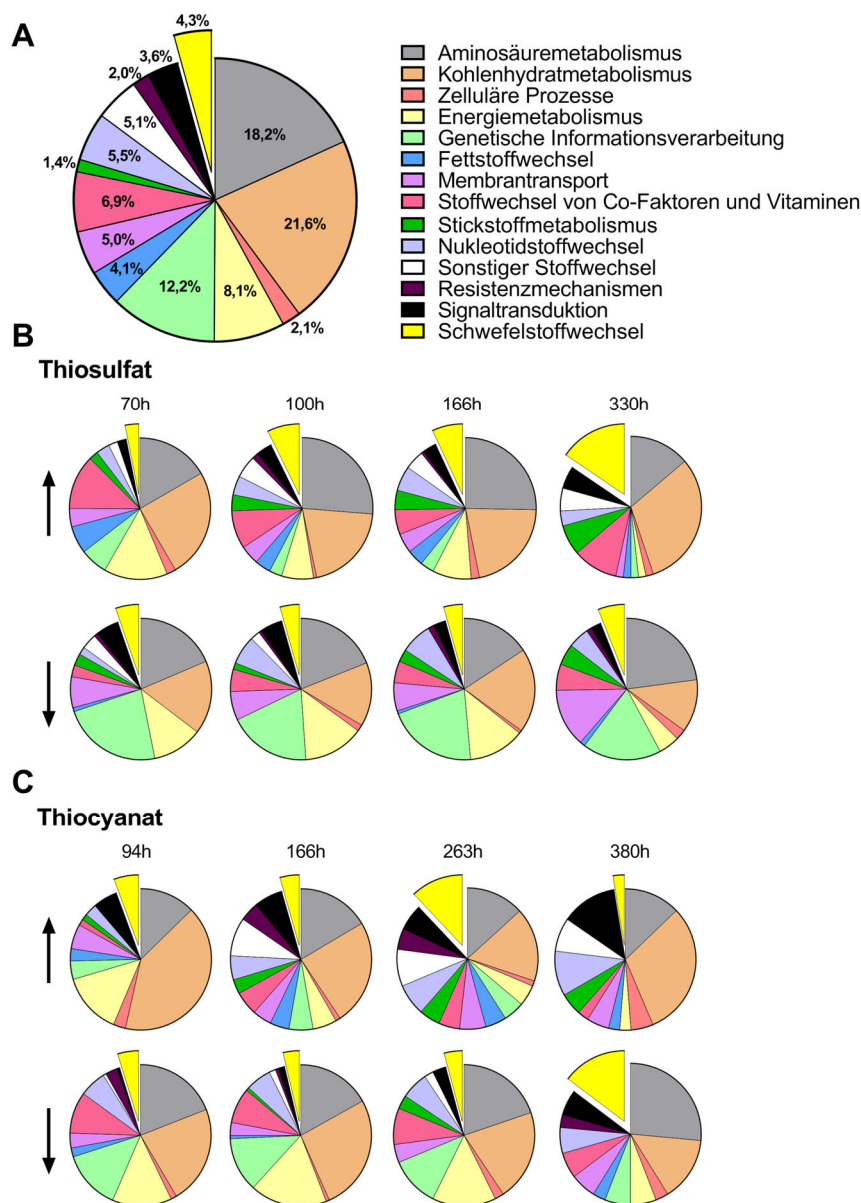
etwa 45 % entsprechen. Hierbei wurde deutlich, dass die biologischen und technischen Replikate eines jeden Kultivierungszeitpunkts clustern und sich klar von anderen Kultivierungszeitpunkten differenzieren (Abb. 7.7 B). Dies deutet sowohl auf eine gute Reproduzierbarkeit der Probenvorbereitung als auch der SWATH-LC-MS/MS Messungen hin und korreliert ebenfalls mit den voneinander differenzierbaren Proteinmustern der SDS-PAGE (vgl. Abb. 7.6 AC). Interessanterweise deutet die PC Analyse auf deutliche molekulare Unterschiede bei Kultivierung mit Thiosulfat gegenüber der Verwendung von Thiocyanat als Elektronendonator hin. Es kommt bei der Verwendung der verschiedenen Energiequellen demnach nicht nur zur Änderung der Abundanzen einzelner, weniger Thiosulfat- bzw. Thiocyanat-spezifischer Proteine, sondern zu einer globaleren Umstellung des Gesamtstoffwechsels. Diese Schlussfolgerung wird von Kultivierungsversuchen unterstützt, in denen *Tv. paradoxus* erst mit Thiosulfat als Energiequelle kultiviert und anschließend in Medium mit Thiocyanat überführt wurde. Die Adaption an das neue Medium dauerte ca. sieben Tage. Erst anschließend kam es zu der charakteristischen Schwefelbildung der Kulturen und zu mikroskopisch sichtbarem Zellwachstum. Gleiches wurde im umgekehrten Fall beobachtet, wenn Zellen mit Thiocyanat vorkultiviert und anschließend in Medium mit Thiosulfat überführt wurden (Daten nicht gezeigt). Eine vergleichbar starke Differenzierung des Stoffwechsels in Abhängigkeit des Elektronendonors wurde bereits in einer Transkriptomanalyse von *Tv. thiocyanoxidans* beobachtet (Berben *et al.*, 2017a).

Alle in der Proteomstudie quantifizierten Proteine wurden auf Basis ihrer KEGG-Annotation (Kanehisa *et al.*, 2019) funktionellen Gruppen zugewiesen (Abb. 7.8 A). Die Analyse ergab, dass die größten Gruppen aller Proteine dem Aminosäure- und Kohlenhydratmetabolismus zugeordnet werden können (18,2 bzw. 21,6 % des Gesamtproteoms mit 1 951 Proteinen; Abb. 7.8 A). Der Schwefel-

metabolismus hat einem Anteil von 4,3 %. Um Änderungen im Anteil der funktionellen Gruppen festzustellen wurde die Abundanz von Proteinen mit einem *fold change* von jeweils  $<0,5$  bzw.  $>2$  bei Signifikanzniveaus (*p-value*)  $<0,05$  als signifikant verändert definiert. Während der Kultivierung mit Thiosulfat kam es zu sukzessiv steigenden Abundanzen von signifikanten, Schwefelmetabolismus-assoziierten Proteinen bis 330 h (normiert auf die Abundanz der Proteine zum Zeitpunkt 42 h; Abb. 7.8 B). Hierbei zeigten vor allem zwei Flavocytochrom c Sulfid Dehydrogenasen (FccB 1 und 2), die Sulfid-Chinon Oxidoreduktase (SQOR) und die SOR signifikante Veränderungen. Proteine des Energiemetabolismus und des Membrantransports waren mit zunehmender Kultivierungsdauer signifikant reduziert, während Proteine des Stickstoff-Metabolismus über den Kultivierungszeitraum teilweise in signifikant erhöhten und teilweise in erniedrigten Häufigkeiten vorkamen. Proteine, die an der Verarbeitung genetischer Informationen beteiligt sind, waren dagegen in deutlich geringerer Menge vorhanden.

Die Kultivierung mit Thiocyanat führte zunächst zu einem Anstieg von Schwefelproteinen bis 263 h (normiert auf 56 h, insbesondere FccB\_1 und 2), bei einem anschließenden Abfall in spätstationären Phasen (Abb. 7.8 C). Zu diesem Kultivierungszeitpunkt sind dafür eine Vielzahl der Schwefelproteine in geringer Menge vorhanden. Hierbei waren vor allem AprAB, SoxY, DsrB und eine dritte Flavocytochrom c Sulfid Dehydrogenase (FccB\_3) betroffen. Proteine des Stickstoffmetabolismus nahmen eine geringere Rolle ein, als wenn *Tv. paradoxus* mit Thiosulfat als Energiequelle kultiviert wurde. In Anwesenheit von Thiosulfat sind insbesondere ein Nitratbindeprotein (Gen ID: THITH\_05385), eine  $\alpha$ -Carboanhydrase (THITH\_10555), eine Nitrit- (THITH\_16205) und eine Nitrat Reduktase (THITH\_07515) in hohen Mengen vorhanden, wobei die Nitrat/Nitrit-reduzierenden Proteine in einem Operon organisiert





**Abbildung 7.8** | Einordnung der 1 951 in der Proteomanalyse qualitativ nachgewiesenen *Tv. paradoxus* Proteine in funktionelle Gruppen basierend auf ihrer KEGG-Annotation. **A**, Globale Einordnung der Proteine. **B**, Einordnung von Proteinen mit signifikanter erhöhter (oberes Panel) bzw. erniedrigter (unteres Panel) Abundanz zu verschiedenen Kultivierungszeitpunkten mit Thiosulfat als Energiequelle normiert auf ihrer relativen Häufigkeit nach 42 h. **C**, Wie B, jedoch mit Thiocyanat als Energiequelle, normiert auf ihrer relativen Häufigkeit nach 56 h. Die Einordnung in B und C basiert auf allen 1 680 quantifizierten Proteinen.

sind (Vgl. Abb. 7.12 B). Mit Thiocyanat kam es zu einem signifikanten Anstieg von Stickstoffmetabolismus-Proteinen nach 94 h, insbesondere einer Nitrit-Reduktase (THITH\_16205), wobei anschließend nur wenige Proteine in erhöhten Mengen vorhanden waren. In spätstationären Wachstumsphasen waren Proteine des Stickstoffmetabolismus

weder in signifikant erhöhten, noch in signifikant verringerten Mengen vorhanden. Analog zur Kultivierung mit Thiosulfat nahmen auch Energiemetabolismus-Proteine mit zunehmender Kultivierungsdauer ab, dafür kam es zu einem Anstieg von Proteinen, die an der Signaltransduktion beteiligt sind. In beiden Fällen, sowohl mit Thiosulfat als auch mit

Thiocyanat, scheint der Kohlenhydratmetabolismus eine wichtige Rolle sowohl in frühexponentiellen als auch in spätstationären Wachstumsphasen einzunehmen. Vor allem kamen hier Proteine des Citrat-Zyklus und des Pyruvat-Metabolismus in signifikant hohen Mengen vor, aber auch solche des Aminosücker- und Nukleotidzuckerstoffwechsels. In spätexponentiellen bzw. frühstationären Phasen wurde der Kohlenhydratstoffwechsel dagegen herunterreguliert.

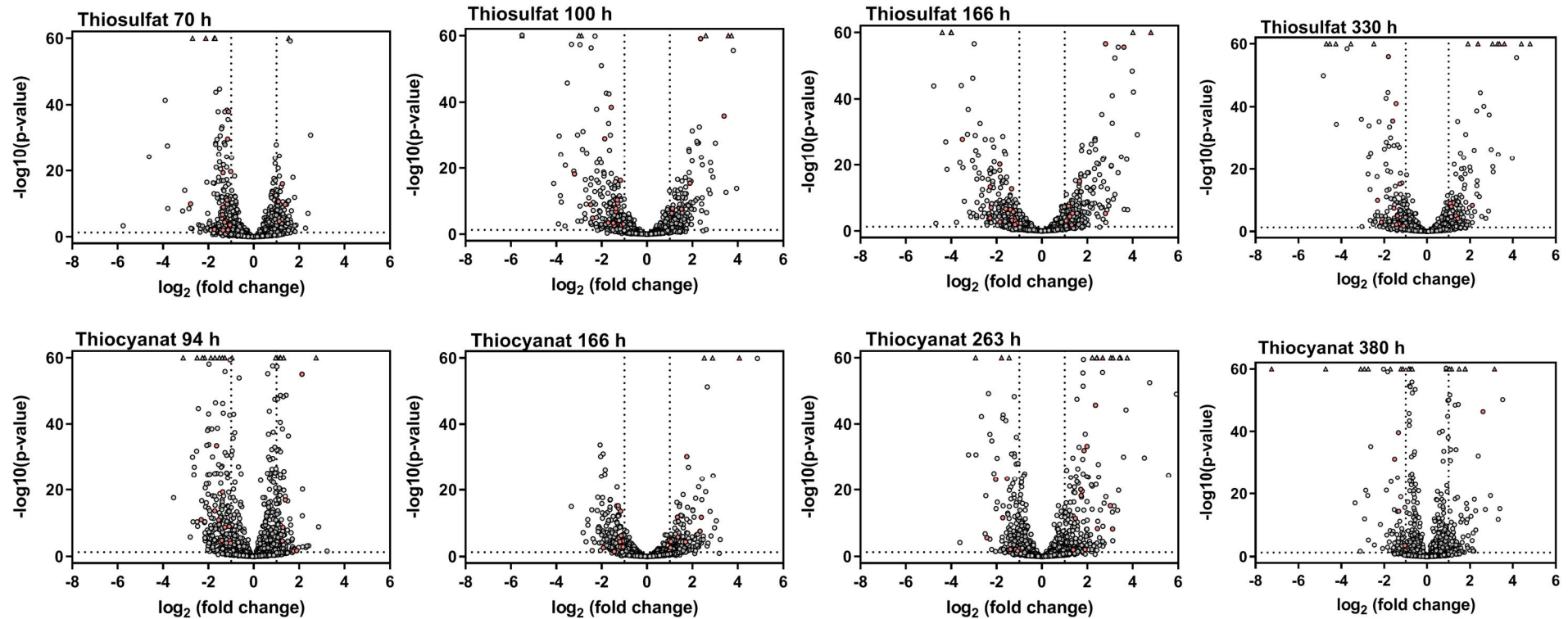
*Volcano plots* wurden erstellt um festzustellen, ob die ermittelten Abundanzveränderungen der Proteine signifikant sind. Analog zu den statistischen Analysen zur Zuordnung funktioneller Gruppen wurden die Grenzen für das Signifikanzniveau auf  $< 0,05$  mit einem *fold change* von jeweils  $< 0,5$  bzw.  $> 2$  gesetzt. Daraus resultiert ein  $\log_{10} p\text{-value}$  von  $1,3$  und  $\log_2 \text{fold changes}$  von jeweils  $1$  bzw.  $-1$ . Proteine mit einem  $\log_{10} p\text{-value}$  von  $> 1,3$  und gleichzeitig einem  $\log_2 \text{fold change}$  von  $> 1$  bzw.  $< -1$  wurden als statistisch signifikante Veränderungen definiert. Von insgesamt 55 manuell identifizierten Proteinen, die dem Schwefelmetabolismus in *Tv. paradoxus* zugeordnet wurden (s. Anhang, Proteomstudie\_Tv\_paradoxus\_Arh1.xlsx), zeigte die Mehrheit signifikante Änderungen mit Thiosulfat als Energiequelle (Tab. 7.2 und Abb. 7.9, obere Panels, rote Punkte). Durchschnittlich hatten 32 % der Proteine des Schwefelmetabolismus während der Kultivierung mit Thiosulfat eine signifikant höhere Abundanz und 68 % der Proteine eine signifikant erniedrigte. Mit Thiocyanat als Energiequelle wiesen vergleichsweise wenige Proteine Änderungen ihrer relativen Häufigkeit auf, insbesondere

nach 380 h in spätstationären Wachstumsphasen. Von diesen Proteinen hatten durchschnittlich 47 % der am Schwefelmetabolismus beteiligten Proteine eine signifikant höhere Abundanz und 53 % der Proteine eine signifikant niedrigere. Insgesamt wird somit deutlich, dass eine größere Anzahl von Proteinen während der Kultivierung mit Thiosulfat signifikante Änderungen ihrer relativen Häufigkeiten, verglichen mit der Kultivierung mit Thiocyanat, besaßen. Hierbei ist jedoch die Verteilung zu Proteinen mit signifikant erhöhten bzw. erniedrigten Abundanzen in Anwesenheit von Thiocyanat ausgeglichen, wohingegen sie sich in Anwesenheit von Thiosulfat auf der Seite der Proteine mit verringerten relativen Häufigkeiten befindet.

Betrachtet man sich in der globalen Proteomanalyse die Proteine mit den höchsten Abundanzen sind darunter einige zu finden, die dem Schwefelmetabolismus zugeordnet werden können und charakteristische Muster in ihren relativen Häufigkeiten besitzen. (Vgl. Tab. 7.3 und Abb. 7.10). Die im Schwefelmetabolismus involvierten Proteine sind dabei in vergleichbaren Mengen vorhanden, wie bspw. die bakterielle RNA-Polymerase (RpoABC; Abb. 7.10), die Glycerinaldehyd-3-phosphat Dehydrogenase (GAPDH), das Zellteilungsprotein FstA, die DNA-Polymerase I (DNAPI) und eine ATPase, die allesamt essentielle und in größerer Menge benötigte Funktionsproteine darstellen. Ebenso kommt die Ribulose-1,5-bisphosphat-carboxylase /-oxygenase (RuBisCO), welche für die  $\text{CO}_2$ -Fixierung verantwortlich ist, in hohen Mengen vor, wobei die Abundanz des Proteins mit Thiocyanat als Elektronendonator frühexponentiell zwar

**Tabelle 7.2 |** Anzahl von Proteinen des Schwefelstoffwechsels mit signifikanten Änderungen der Abundanz in *Tv. paradoxus*-Kulturen mit Thiosulfat bzw. Thiocyanat, jeweils normiert auf den ersten Zeitpunkt der Probenentnahme und basierend auf den *Volcano plots*.

	Anzahl der Proteine mit signifikanten Abundanzveränderungen			
	70 h	100 h	166 h	330 h
Thiosulfat	25	27	25	19
Thiocyanat	94 h 17	166 h 18	263 h 19	380 h 7



**Abbildung 7.9** | Volcano plots der Proteomanalyse aus *Tv. paradoxus* mit Thiosulfat (obere Panels) bzw. Thiocyanat (untere Panels) als Energiequelle. Die Daten wurden jeweils auf den ersten Zeitpunkt der Probenentnahme normiert (für Thiosulfat: 42 h, für Thiocyanat 56 h). Die Grenzen für das Signifikanzniveau wurden auf  $< 0,05$  mit einem *fold change* von jeweils  $< 0,5$  bzw.  $> 2$  gesetzt und sind als gestrichelte Linie eingezeichnet (entsprechen einem  $\log_{10} p\text{-value}$  von  $> 1,3$  bei einem  $\log_2 \text{fold change}$  von  $> 1$  bzw.  $< -1$ ). Signifikante Proteine des Schwefelmetabolismus sind rot dargestellt. Proteine mit einem  $\log_{10} p\text{-value}$  von  $> 60$  sind auf 60 skaliert und als Dreiecke dargestellt.

**Tabelle 7.3** | Proteine mit den höchsten *fold changes* (positiv) nach den jeweiligen Kultivierungszeitpunkten verglichen mit der jeweiligen frühexponentiellen Probe (42 h bzw. 54 h; nur signifikante Proteine berücksichtigt). Grün hinterlegt sind Proteine, die im Schwefelmetabolismus involviert sind. Proteine wurden teilweise manuell annotiert.

Thiosulfat				
	70 h	100 h	166 h	330 h
1	ADP-Glucose Synthase	ADP-Glucose Synthase	Flavocytochrom c Sulfid Dehydrogenase (FccB)	Uncharakterisiertes Protein
2	UDP-N-Acetylglucosamin 4,6-Dehydratase	3-Hydroxyacyl-ACP-Dehydratase	Aktivator des HSP90	Uncharakterisiertes Protein
3	NADH Dehydrogenase	Flavocytochrom c Sulfid Dehydrogenase (FccB)	ADP-Glucose Synthase	Prolyl-tRNA Synthetase
4	Coproporphyrinogen-Oxidase	O-Acetylhomoserine Amino-carboxypropyl-Transf.	3-Hydroxyacyl-ACP-Dehydratase	CS <sub>2</sub> -Hydrolase
5	Zellformprotein MreC	Schwefel Oxygenase Reduktase (SOR)	CS <sub>2</sub> -Hydrolase	Flavocytochrom c Sulfid Dehydrogenase (FccB)

Thiocyanat				
	94 h	166 h	263 h	380 h
1	TonB-abhängiger Rezeptor	TonB-abhängiger Rezeptor	Uncharakterisiertes Protein	TonB-abhängiger Rezeptor
2	NADH Dehydrogenase I	Flavocytochrom c Sulfid Dehydrogenase (FccB)	Flavocytochrom c Sulfid Dehydrogenase (FccB)	Uncharakterisiertes Protein
3	Häm-Export Protein	Signal-Peptid, unbekannte Funktion	Uncharakterisiertes Protein	MEMO1 Familienprotein
4	Signal-Peptid, unbekannte Funktion	Signal-Peptid, unbekannte Funktion	Lipoprotein, involviert in der NO-Reduktion	Uncharakterisiertes Protein
5	Glycosyl-Hydrolase	Uncharakterisiertes Protein	Uncharakterisiertes Protein	Flavocytochrom c Sulfid Dehydrogenase (FccB)

höher ist, jedoch mit Thiosulfat über den Kultivierungsverlauf stärker zunimmt. Dies ist nicht verwunderlich, da CO<sub>2</sub>-Fixierung in Anwesenheit von Thiosulfat essentiell ist. Bei der Kultivierung mit Thiocyanat kann hingegen der Kohlenstoff aus dem Substrat für anabolische Zwecke genutzt werden.

Schwefel Oxygenase Reduktase (SOR)

Auffällig ist, dass mit der SOR nach 100 h und in Anwesenheit von Thiosulfat ein Enzym des oxidativen Schwefelmetabolismus aus *Tv. paradoxus*, neben einer Flavocytochrom c Sulfid Dehydrogenase und einer CS<sub>2</sub>-Hydrolase, in hohen Mengen vorkommt (bezogen auf das Gesamtproteom; Tab. 7.3). Die Abundanz der SOR ist in Anwesenheit von Thiosulfat nach 42 h gering, steigt im Kultivierungsverlauf jedoch deutlich an mit einer maximalen Ausprägung bei 100 h und anschließender Abnahme, korrelierend mit den erhobenen RNA-Analysen des *sor* Gens (Vgl. Abb. 7.4). Dies ist eben-

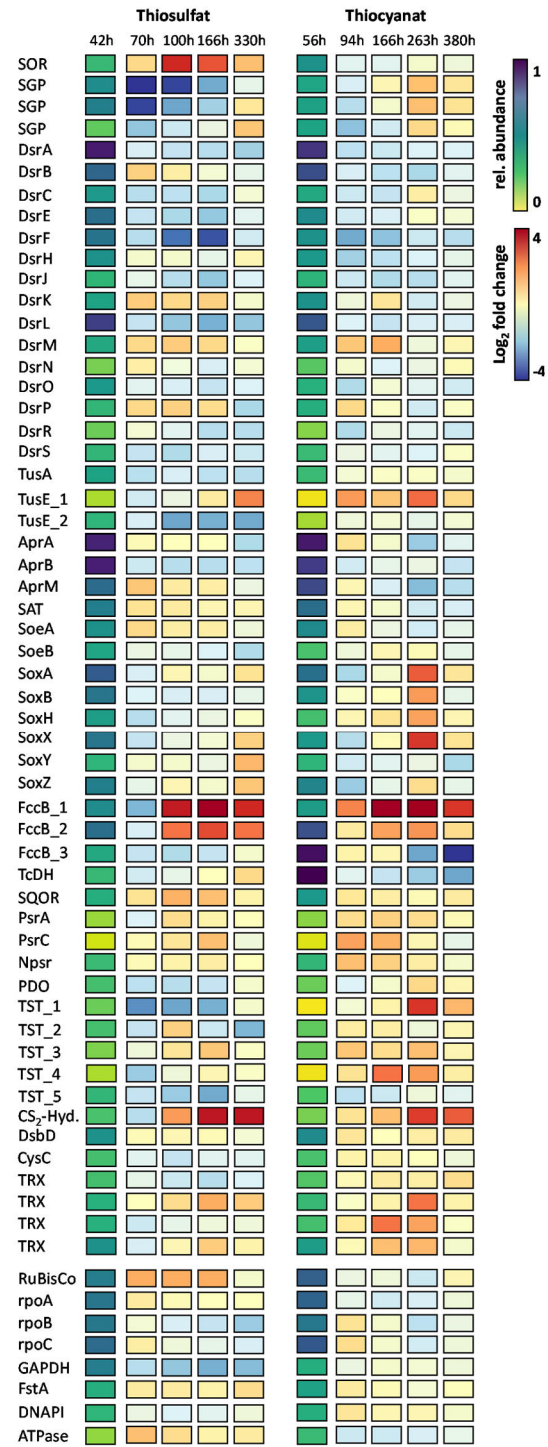
falls in Einklang mit den mikroskopischen Analysen der intrazellulären Schwefeleinlagerungen und den annotierten Schwefelkugelpoteinen (*sulfur globule protein*, SGP). Diese sind bereits nach 42 h in höheren Mengen vorhanden und nehmen anschließend deutlich ab. In Anwesenheit von Thiocyanat sind diese Muster nicht so deutlich ausgeprägt, wobei die SOR bereits nach 56 h in höheren Mengen vorkommt und anschließend auf einem ähnlichen Niveau verbleibt (Abb. 7.10 und 7.11). Die generell höheren Abundanzen in Anwesenheit von Thiosulfat korrelieren mit der makroskopisch sichtbaren, stärkeren Bildung von elementarem Schwefel im Vergleich zu Thiocyanat-Kulturen. Hieraus lässt sich ableiten, dass die SOR im oxidativen Schwefelmetabolismus von *Tv. paradoxus*, vor allem in Anwesenheit hoher Mengen elementaren Schwefels, eine zentrale Rolle einnimmt, wie es bereits nach den Transkriptionsanalysen vermutet worden war (s. Kap. 7.1).

Schwefel Oxidationskomplex (Sox)

Proteine des Schwefel Oxidationskomplexes zeigten differentielle Abundanzen über den Kultivierungsverlauf (Abb. 7.10). Mit Thiosulfat als Elektronendonator blieben die Mengen von SoxA,B,H,X,Y und Z konstant über den Kultivierungszeitraum. Lediglich nach 330 h kam zu leicht erhöhten, aber signifikanten Änderungen der Abundanzen von SoxX,Y und Z im Vergleich zur ersten Probenentnahme bei 42 h ( $\log_2 \text{fold change}$ : 1,2). In Anwesenheit von Thiocyanat war nach 263 h, mit einer durchschnittlich fünffachen Erhöhung der Proteinmenge, ein signifikanter Anstieg der SoxA,B,H und X Mengen vorhanden. Dies korreliert mit der Konzentration der *soxA* Transkriptmengen nach 162 h (~20-facher Anstieg im Vergleich zum Zeitpunkt  $t_1$  in Anwesenheit von Thiocyanat; Vgl. Abb. 7.5). Es scheint demnach so, dass der Sox-Komplex insbesondere mit Thiosulfat als Elektronendonator in frühstationären Wachstumsphasen für die Schwefeloxidation verantwortlich zu sein scheint und in Anwesenheit von Thiocyanat erst in stationären Phasen eine bedeutendere Rolle einnimmt (Vgl. Abb. 7.11).

Persulfid Dioxygenase (PDO)

Die putative PDO zeigt, wie auch in den Transkript-Analysen (vgl. Abb. 7.5), sehr geringe Abundanzen (Abb. 7.10). Zum einen könnte dies ein Hinweis auf eine untergeordnete Rolle der  $\text{H}_2\text{S}$ -Oxidation in *Tv. paradoxus* sein, zum anderen ist eine Kompensation über einen anderen  $\text{H}_2\text{S}$ -Oxidationsweg in *Tv. paradoxus* denkbar, insbesondere über die Flavocytochrom *c* Dehydrogenase (FccAB). Es ist darüber hinaus jedoch nicht auszuschließen, dass ein bisher nicht als PDO-klassifiziertes Enzym die Funktion übernimmt. In der hier erhobenen Proteomanalyse besitzt eine putative Metallo- $\beta$ -Lactamase in nahezu allen Wachstumsstadien signifikant erhöhte Abundanzen, wenn Thiosulfat und nicht Thiocyanat als Energiequelle genutzt wurde. Diese Metallo- $\beta$ -Lactamase (Uniprot ID: W0DNN5) hat jedoch lediglich eine Sequenzähnlichkeit



**Abbildung 7.10 |** Heat Maps von Proteinen, die am dissimilatorischen Schwefelmetabolismus beteiligt sind (obere Panels) und von ausgewählten Referenzproteinen (untere Panels) in Anwesenheit von Thiosulfat bzw. Thiocyanat. In der jeweils ersten Spalte sind die relativen Abundanzen der Proteine zum ersten Zeitpunkt der Probenentnahme dargestellt, in den darauffolgenden vier Spalten die relativen Abundanzen normiert auf  $t_1$ . Abkürzungen und die zugehörigen Uniprot IDs sind im elektronischen Anhang (Proteomstudie\_Tv\_paradoxus\_Arh1.xlsx) aufgeführt.

von 30,5 % zu der humanen PDO (hETHE1, PDB ID: 4CHL, siehe Kapitel 3 für weitere Details zu PDOs), verglichen mit 46,9 % der initial identifizierten putativen PDO, deren Gen auch in den Transkriptionsanalysen untersucht wurde. Dennoch erscheint die identifizierte Metallo- $\beta$ -Lactamase aufgrund ihrer deutlich höheren Abundanz in *Tv. paradoxus* mit durchschnittlichen *fold changes* von 4,1 gegenüber der ursprünglich untersuchten PDO als ein wahrscheinlicherer Kandidat für etwaige PDO-Aktivitäten.

### Dissimilatorische Sulfit Reduktase (Dsr)

Proteine der dissimilatorischen Sulfit Reduktase (DsrA-S) sind in einem Operon angeordnet (Abb. 7.12 A) und weisen bereits früh-exponentiell sehr hohe relative Häufigkeiten auf, insbesondere DsrA, B und L, wobei es bei den meisten mit zunehmenden Kultivierungsverlauf zu einem leichten quantitativen Rückgang kommt (Abb. 7.10). Lediglich DsrB, DsrK, DsrM und DsrP zeigen schwache Zunahmen nach 70 h Kultivierungsdauer (ausgenommen DsrB mit Thiocyanat als Elektronendonator), wobei letztere Drei die geringsten Abundanzen nach 42 h besaßen. Insgesamt sind die Dsr-Proteine in Anwesenheit von Thiosulfat stärker repräsentiert (durchschnittlich doppelt so hoch; Abb. 7.11). Die hohen Mengen der Dsr-Proteine sind insofern verwunderlich, als dass es sich zumeist um ein System der Schwefelreduktion handelt. Hier scheint der Komplex jedoch in die oxidative Richtung zu arbeiten, eine Beobachtung, die bereits für grüne Schwefelbakterien und *Allochrodatum vinosum* getätigt wurde (Dahl *et al.*, 2005, Gregersen *et al.*, 2011, Holkenbrink *et al.*, 2011). Der Dsr-Komplex ist in den Organismen nicht an der Sulfit-Reduktion, sondern maßgeblich an der Oxidation von Sulfid bzw. Polysulfid, aber auch von Thiosulfat beteiligt, mit elementarem Schwefel als Reaktionsprodukt (Dahl *et al.*, 2008a, Frigaard & Dahl, 2009). Dies könnte ebenfalls als Erklärung für die schnelle, enzymatische Schwefelbildung in *Tv. paradoxus* dienen.

### CS<sub>2</sub>-Hydrolase und Thiocyanat Dehydrogenase (TcDH)

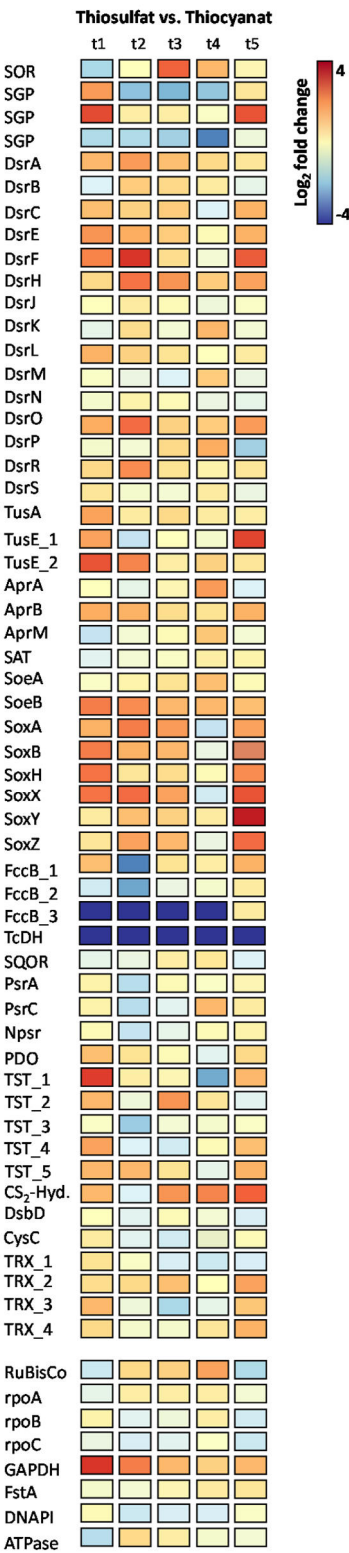
Interessanterweise kommt es, sowohl in Anwesenheit von Thiosulfat als auch von Thiocyanat, zu einem deutlichen Anstieg einer CS<sub>2</sub>-Hydrolase zur stationären Phase hin (Abb. 7.10). CS<sub>2</sub>-Hydrolasen konvertieren Kohlenstoff-Disulfid (CS<sub>2</sub>) und Carbonyl-Sulfid (COS) zusammen mit Wasser zu H<sub>2</sub>S und CO<sub>2</sub>. Der entsprechende COS-*pathway* wurde bereits im Zusammenhang mit der Degradation von Thiocyanat in *Thioalkalivibrio sp.* beschrieben (Sorokin *et al.*, 2001). Hierbei wird die C≡N Bindung des Thiocyanates durch eine Thiocyanat Hydrolase (SCN<sup>-</sup>) zu COS und Ammonium gespalten. Vergleichende Genomanalysen verschiedener *Thioalkalivibrio sp.* zeigen, dass das Vorkommen der Thiocyanat Hydrolase auf lediglich zwei Spezies, *Thiobacillus thioparus* und *Tv. thiocyanodenitrificans*, beschränkt ist (Berben *et al.*, 2017b), sodass unklar bleibt welches Enzym die Rolle in *Tv. paradoxus* übernimmt. COS wird anschließend durch die CS<sub>2</sub>-Hydrolase zu CO<sub>2</sub> und Sulfid hydrolysiert, welches anschließend dem gewöhnlichen Schwefeloxidaions-*pathway* zur Verfügung steht. Alternativ kommt es vermutlich zu einer direkten Oxidation des Schwefelatoms durch die Thiocyanat Dehydrogenase (TcDH), was deren erhöhtes Vorkommen in stationären Wachstumsphasen in Anwesenheit von Thiosulfat erklärt (Verdoppelung der Abundanz im Vergleich zu frühstationären Wachstumsphasen). In Anwesenheit von Thiocyanat besitzt die TcDH erwartungsgemäß eine sehr hohe Abundanz und ist vermutlich direkt an der Oxidation der Schwefelgruppe des Thiocyanates zu elementarem Schwefel beteiligt (Abb. 7.10 und 7.11) (Berben, 2019). In dem Zusammenhang zeigt eines von insgesamt drei Fcc-Proteinen (FccB\_3) vergleichbar hohe relative Häufigkeiten wenn Thiocyanat als Elektronendonator verwendet wurde (Abb. 7.11). Hierbei handelt es sich womöglich um eine Thiocyanatspezifische Sulfid Dehydrogenase. Eine ähnliche Hypothese wurde bereits mit der Struk-



turaufklärung exakt dieser Fcc aus *Tv. paradoxus* aufgestellt, wobei sie einen Komplex mit einem Kupferbindeprotein und der TcDH eingeht um Thiocyanat zu oxidieren und mit dem entstehenden Schwefel zu reagieren (Osipov *et al.*, 2018). TcDH ist, zusammen mit vier ABC-Transporter-Untereinheiten, zwei hypothetischen Proteinen und einem putativen Zweikomponenten-Regulationssystem, in einem Operon-ähnlichen Gencluster angeordnet (Abb. 7.12 C). Diese Gencluster wird einerseits *downstream* von drei Genen, die für die FccAB\_3-Untereinheiten und ein Cytochrom *c* codieren und *upstream* von Kupferresistenzgenen (*copCD*), einer A-Untereinheit eines TAT-Systems und einem multiplen Antibiotikaresistenz-System *ychE* flankiert. Alle identifizierten Proteine dieses Genclusters zeigten in Anwesenheit von Thiocyanat über die gesamte Wachstumsperiode stark erhöhte Abundanzen im Vergleich zur Kultivierung mit Thiosulfat (durchschnittliche  $\log_2$  fold changes 0,24 beim Vergleich von Thiosulfat vs. Thiocyanat).

Flavocytochrom *c* Sulfid Dehydrogenasen (FccB\_1, 2 und 3)

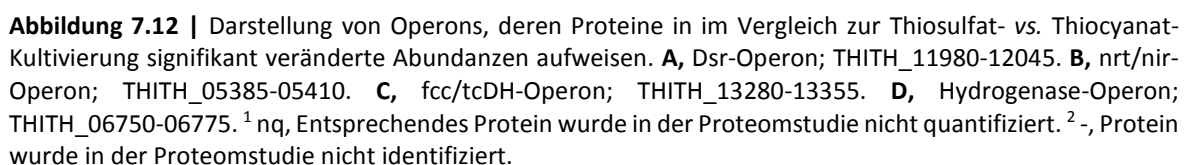
Unter den drei Flavocytochrom *c* Sulfid Dehydrogenasen findet sich FccB\_1 bei den Top-Treffern der meist abundanten Proteine bezogen auf das Gesamtproteom (Uniprot ID: W0DRF9), unabhängig ob *Tv. paradoxus* mit Thiosulfat oder Thiocyanat kultiviert worden war (Tab. 7.1). FccB\_1 und FccB\_2 zeigten über den zeitlichen Verlauf eine stetige Zunahme ihrer Abundanz im Vergleich zum Zeitpunkt der ersten Probenentnahme, sowohl in Anwesenheit von Thiosulfat als auch von Thiocyanat (Abb. 7.10). Fcc-Proteine sind Heterodimere, gebildet aus Flavoproteinen (FccB) und einem Di-Häm-Cytochrom *c* (FccA), die Schwefelwasserstoff zu elementaren Schwefel oxidieren. Die hohe Abundanz lässt auf eine zentrale Rolle von FccB\_1 und FccB\_2 im oxidativen Schwefelmetabolismus, unabhängig von der Verfügbarkeit der Energiequelle,



**Abbildung 7.11** | Heat Map vom Vergleich der fold changes in Anwesenheit von Thiosulfat- vs. Thiocyanat-Kultivierung. Abkürzungen und zugehörige Uniprot IDs sind im elektronischen Anhang (Proteomstudie\_Tv\_paradoxus\_Arh1.xlsx) aufgeführt.

Ein zweites, nicht-homologes Sulfit-oxidierendes Molybdoenzym, SorAB (nicht zu verwechseln mit der Schwefel Oxygenase Reduktase; SOR), enthält ein reduziertes Cytochrom c, allerdings fehlen die Gene in *Tv. paradoxus* als einzigem Vertreter der *Thioalkalivibro-*

Der Sulfite-oxidierende Molybdoenzymkomplex besteht aus drei Untereinheiten (SoeABC) und ist essentiell für die direkte Sulfite-Oxidation zu Sulfat (vermutlich Sulfite:Chinoxidoreduktase) (Dahl *et al.*, 2013). SoeABC liegen im Mittelfeld der absoluten Abundanzen bezogen auf das Gesamtproteom und zeigten sowohl mit Thiosulfat als auch mit



Gattung, weshalb das Enzym hier keine Rolle spielt.

### Adenosinphosphosulfat Reduktase (Apr)

Die beiden Untereinheiten der Adenosinphosphosulfat Reduktase (AprA und B, häufig auch als APS Reduktase bezeichnet) sind bereits nach 42 bzw. 56 h in hohen Mengen vorhanden, ohne signifikante Veränderungen über den Kultivierungszeitraum (Abb. 7.10). Dies ist nicht verwunderlich, da Adenosinphosphosulfat Reduktasen bidirektionale Schlüsselenzyme der dissimilatorischen Sulfatreduktion und Sulfitoxidation sind (Lampreia *et al.*, 1994, Fritz *et al.*, 2000). Im oxidativen Weg katalysieren AprAB eine zwei-Elektronen-Oxidationsreaktion zwischen Sulfit und Adenosin-Monophosphat zu 5'-Adenosin-Phosphosulfat (APS). Energie wird über eine Substratstufenphosphorylierung gewonnen, indem die ATP Sulfurylase (Sat) den AMP-Anteil aus APS auf Pyrophosphat überträgt (Parey *et al.*, 2013). Sat weist mit Abundanzen von durchschnittlich 7 % verglichen mit den AprAB-Untereinheiten eine deutlich geringere Häufigkeit auf. Eine Hochregulation der *aprAB* Gene im Vergleich zum *sat* Gen wurde bereits in der Transkriptomstudie von *Tv. thiocyanoxidans* beobachtet, wobei die Gründe für das Ungleichgewicht ungeklärt blieben (Berben *et al.*, 2017a). Aufgrund der deutlich höheren Mengen der beiden Apr-Untereinheiten (zwischen 20 und 48 x höhere Mengen im Vergleich zu SoeAB, sowohl mit Thiosulfat als auch mit Thiocyanat) nimmt der indirekte Weg der Sulfit-Oxidation offensichtlich einen größeren Stellenwert im Metabolismus von *Tv. paradoxus* ein als der direkte über den Sulfit-oxidierenden Enzymkomplex.

### Nitrat/Nitrit-Reduktase

Es war auffällig, dass Proteine, die an der Nitrat- und Nitrit-Reduktion beteiligt sind alle erhöhte Abundanzen zeigten, wenn Thiosul-

fat als Elektronendonator verwendet wurde (Abb. 7.12 B). Dies war zu erwarten, da Nitrat für die Kultivierung mit Thiosulfat zugesetzt worden war und wie zuvor beobachtet (Sorokin *et al.*, 2002) offenkundig neben Sauerstoff als zweiter Elektronenakzeptor fungiert. Die Nitrat- und Nitrit-Reduktasegene sind wie ein Operon organisiert (Gennummern: THITH\_05385 bis THITH\_05410). In Kulturen mit Thiosulfat waren die dort codierten Proteine innerhalb der ersten 100 h signifikant hochreguliert. Anschließend wiesen lediglich die Nitrat/Nitrit-Bindeproteine (NrtA/NrtB) signifikant höhere relative Häufigkeiten im Vergleich zur Kultivierung mit Thiocyanat bis in spätstationäre Wachstumsphasen auf. Möglicherweise spielen in Thiocyanat-Kulturen aus Thiocyanat freigesetzte Stickstoffverbindungen in späteren Wachstumsphasen eine Rolle.

### Ni<sup>2+</sup>-abhängige Hydrogenase

Im Gegensatz dazu sind Nickel-abhängige Hydrogenase-Proteine, in Anwesenheit von Thiocyanat hochreguliert (Abb. 7.12 D). Die Gene sind ebenfalls wie ein Operon organisiert (THITH\_06750 bis THITH\_06775), wobei die Rolle der Hydrogenase im Thiocyanat-Metabolismus nicht bekannt ist.

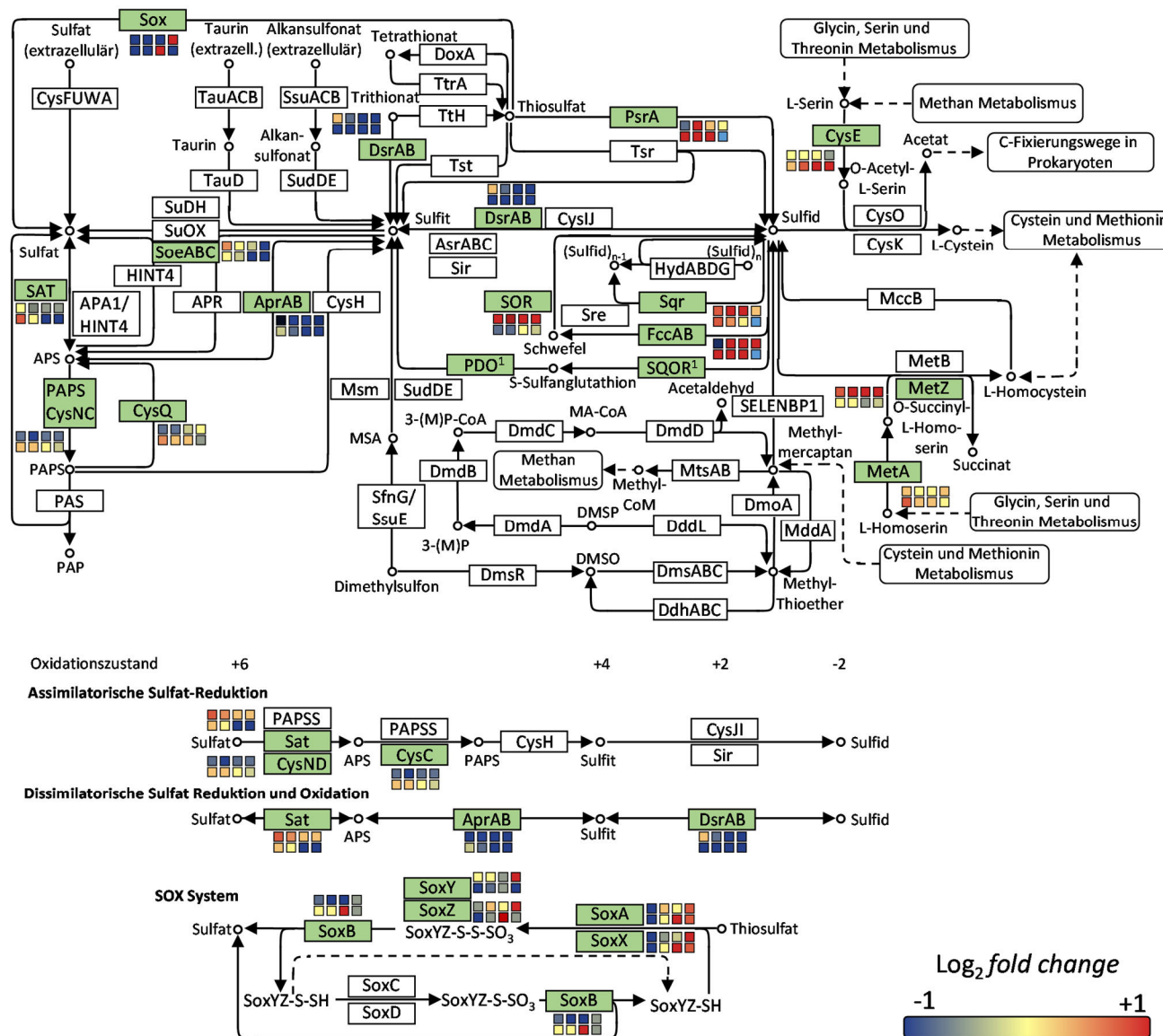
### Einordnung in den Schwefelmetabolismus nach KEGG

Eine Einordnung der in der Proteomanalyse identifizierten Proteine mit dem zugrundeliegenden KEGG-Pathway für den Schwefelmetabolismus für *Tv. paradoxus* ARh1<sup>7</sup> zeigen, dass alle Proteine, für die eine KEGG-Annotation vorliegt, in der hier durchgeführten Proteomanalyse gefunden wurden (Abb. 7.13; s. elektronischen Anhang [KEGG-Pathways] für die Darstellung von allen weiteren KEGG-Metabolismus-pathways mit relativen Proteinhäufigkeiten der in der Proteomstudie identifizierten Proteine). Für die Analysen wurden, nicht wie in den Heat-Maps in Abbildung

<sup>7</sup> <https://www.genome.jp/kegg>

7.10-12, die Schwefelproteine auf die Abundanzen der Proteine aus dem Gesamtproteom normiert, sondern lediglich auf solche mit den höchsten Vorkommen der zugrundeliegenden KEGG-Analyse. Außerdem wurden die Grenzen der  $\log_2 \text{fold changes}$  auf +1 und -1 herabgesetzt. Anhand der Darstellung wird das Zusammenspiel der einzelnen Schwefeloxidaionsproteine erkennbar. Hierbei wird deutlich, dass insbesondere die Proteine, die an der Sulfid-Oxidation beteiligt sind, sowohl in Anwesenheit von Thiosulfat als auch von Thiocyanat, im Verlauf der Kultivierung eine signifikante Erhöhung ihrer Abundanzen aufweisen. Proteine des Schwe-

feloxidationskomplexes kommen dagegen vor allem in späten Wachstumsphasen in hohen Mengen vor, unabhängig von der Wahl des Elektronendonors. Dagegen zeigen Proteine der assimilatorischen Sulfat-Reduktion nur in Anwesenheit von Thiocyanat signifikant erhöhte relative Häufigkeiten (CysCND, Adenylylsulfat-Reduktase), die jedoch deutlich geringer sind als die Abundanzen von Proteinen, die an der der dissimilatorischen Sulfat-Reduktion/Oxidation beteiligt sind (Sat, AprAB, DsrAB). Dies zeigt einmal mehr, dass sowohl Apr als auch Dsr in *Tv. paradoxus* ARh1 bidirektional zu arbeiten scheinen.



**Abbildung 7.13 |** Vergleichende Analysen der Abundanzen von Proteinen gemäß der Einordnung der *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes* (KEGG) in den Schwefelmetabolismus. Im Gegensatz zu den vorherigen *heat map* Darstellungen wurde hier lediglich auf die Proteine aus der KEGG-Datenbank normiert und nicht auf alle Proteine der Proteomanalyse. Analog hierzu wurden die Log<sub>2</sub> fold changes zwischen -1 und +1 gesetzt. Obere Panels zeigen dabei jeweils die Veränderungen der Proteinhäufigkeiten mit Thiosulfat als Energiequelle, die unteren mit Thiocyanat. Normiert wurde weiterhin auf den jeweiligen ersten Zeitpunkt der Probenentnahme.

<sup>1</sup> Die PDO und SQOR sind in der KEGG-Datenbank nicht verzeichnet und wurden entsprechend der Zuordnung der *Heat maps* manuell zugefügt.

## Diskussion

*Tv. paradoxus* ist ein obligat haloalkaliphiles, chemolithoautotrophes Gammaproteobakterium, welches aus Sodaseen isoliert wurde und in der Lage ist eine große Spanne reduzierter Schwefelverbindungen, wie Sulfid, Thiosulfat, Thiocyanat und Schwefel zu oxidieren. Während seines Wachstums mit Thiosulfat oder Thiocyanat als Energiequelle lagert der Organismus intrazelluläre Schwefelkugeln als Zwischenprodukt ein (Sorokin *et al.*, 2002). Dies resultiert zunächst in einer milchigen Verfärbung der Kultur mit lichtmikroskopisch sichtbaren Schwefeleinlagerungen (s. Kap. 7.1; Abb. 7.1). Die weißen, milchigen Verfärbungen nahmen mit zunehmenden Kultivierungsverlauf ab und die Kultur bekam eine rötliche Färbung aufgrund der Bildung von verschiedenen Cytochromen *c* (s. Abb. 7.1 und 7.6). Die Einlagerung von Schwefel ist vor allem in vielen photo- und chemotrophen Schwefel-oxidierenden Bakterien zu finden, wobei Schwefelkugeln sowohl intrazellulär als auch extrazellulär vorkommen können (Franz *et al.*, 2007, Marnocha *et al.*, 2016). Ursächlich scheint in vielen Fällen der unvollständige Sox-Komplex zu sein. In dem so genannten „verkürzten“ oder „unvollständigen“ Sox-Weg fehlen die *soxCD*-Gene. Für *Al. vinosum* wurde beispielweise gezeigt, dass der verkürzte Sox-Weg womöglich der Grund für die Einlagerung von Schwefelkugeln ist (Ghosh & Dam, 2009, Welte *et al.*, 2009). Aufgrund hoher Abundanzen von FccB-Proteinen (s. Kap. 7.3) könnte jedoch auch die periplasmatische Sulfid-Oxidation in *Tv. paradoxus* hierfür verantwortlich sein (s. unten; Schwefeloxidation über FccAB und SOR). SEM-Aufnahmen, welche im Rahmen dieser Arbeit angefertigt wurden (s. Kap. 7.1, Abb. 7.2), deuteten darüber hinaus auf die Einbettung von *Tv. paradoxus* Zellen in großen extrazellulären Schwefelakkumulationen hin. Diese traten in exponentiellen Wachstumsphasen auf

und verschwanden im späteren Verlauf, korrelierend mit lichtmikroskopischen Beobachtungen des Auftretens von Schwefelkugeln. Denkbar ist, dass überschüssiger Schwefel aktiv ausgeschleust wird, wenn die Zellen bereits hohe Mengen  $S^0$  in Schwefelkugeln abgelagert haben.

Kohlenstoffdisulfid-Fixierung in geringen Mengen wurde für *Tv. paradoxus* als einzigen Vertreter seiner Gattung beschrieben (Sorokin *et al.*, 2002), wobei das entsprechende Protein zunächst nicht gefunden wurde. Im Gegensatz dazu wurde in *Tv. nitratireducens* ein Gen identifiziert, welches für eine Kohlenstoffdisulfid-Hydrolase ( $CS_2$ -Hydrolase) kodiert. Mögliches Wachstum mit  $CS_2$  oder eine  $CS_2$ -Aktivität wurde in dem Organismus jedoch bislang nicht untersucht (Berben, 2019). Anhand von Sequenzvergleichen wurde auch im *Tv. paradoxus* Genom ein Homolog zu einer  $CS_2$ -Hydrolase aus *Thiobacillus thioparus* identifiziert (Ogawa *et al.*, 2013). Interessanterweise gehörte diese in spätexponentiellen und stationären Wachstumsphasen zu den Proteinen mit den höchsten Proteinabundanzen, was auf eine höhere  $CS_2$ -Oxidationsrate in *Tv. paradoxus* schließen lässt als initial vermutet (s. Abb. 7.10).

Abgesehen von der  $CS_2$ -Hydrolase und der SOR ist das Vorhandensein von Proteinen des Schwefelmetabolismus in *Tv. paradoxus* ähnlich zu denen des anaeroben, phototautotrophen Gammaproteobakterium *Al. vinosum* (Tab. 7.4). Dies lässt auf vergleichbare Schwefel-Oxidationswege in beiden Organismen schließen, wobei die Funktion der SOR als zentrales Enzym der  $S^0$ -Oxidation durch oxidativ arbeitende Dsr-Proteinen übernommen werden könnte. Überraschenderweise deuten Vergleiche mit dem acidophilen Bakterium *At. caldus* ebenfalls auf eine grundlegend ähnliche Konstitution von Proteinen des Schwefelmetabolismus hin. Sowohl *Tv. para-*



**Tabelle 7.4** | Vergleiche von Temperatur- bzw. pH-Optima und von Proteinen des dissimilatorischen Schwefelmetabolismus in *Al. vinosum*, *Tv. paradoxus* und *At. caldus*. <sup>a</sup>, unvollständiger Sox-Komplex, ohne SoxCD.

	<i>Al. vinosum</i>	<i>Tv. paradoxus</i>	<i>At. caldus</i>
T <sub>Opt</sub>	30-35 °C <sup>1</sup>	30-37 °C <sup>2, 3</sup>	45 °C <sup>4</sup>
pH <sub>Opt</sub>	6,5-7,6 <sup>1</sup>	10 <sup>2</sup>	2,0-2,5 <sup>4</sup>
Apr	x	x	x
CS <sub>2</sub> -Hyd		x	
Dsr	x	x	
FccB	x	x	
Hdr			x
PDO	x	x	x
Psr	x	x	
SAT	x	x	x
Soe	x	x	x
SOR		x	x
Sox <sup>a</sup>	x	x	x
SQOR	x	x	x
TetH			x
TQO			x
Tus	x	x	

<sup>1</sup> (Imhoff *et al.*, 1998) <sup>2</sup> (Sorokin *et al.*, 2002) <sup>3</sup> Diese Arbeit <sup>4</sup> (Hallberg & Lindström, 1994); (Hallberg *et al.*, 1996)

*doxus* als auch *At. caldus* besitzen Gene für SOR und PDO, welche zentrale Proteine des Schwefelmetabolismus darstellen (s. Kap. 1.3 für Details). Dagegen sind Gene, die an der Sulfid-Oxidation beteiligt sind, wie Fcc und (oxidativ arbeitende) Dsr lediglich in *Tv. paradoxus* enthalten, wohingegen solche der Thiosulfat-Oxidation und der Tetrathionat-Hydrolyse (TetH, TQO) exklusiv in *At. caldus* vorhanden sind. Dies deutet darauf hin, dass die Sulfid-Oxidation in Acidophilen im Vergleich zu Alkaliphilen einer Untergeordnete Rolle einnimmt, vermutlich begründet aufgrund der höheren Flüchtigkeit von H<sub>2</sub>S in sauren Habitaten, wohingegen gezeigt wurde, dass Sulfide in Sedimenten von Sodaseen aufgrund des alkalischen pH's in großen Mengen vorkommen und stabiler sind (Sorokin *et al.*, 2015). Thiosulfat wird vermutlich in *Tv. paradoxus* ausschließlich durch den unvollständigen Sox-Komplex metabolisiert (s. Abb. 7.14).

### Bildung der SOR bei 30 °C

In der hier durchgeführten ersten Proteomstudie eines Vertreters der Gattung *Thioalkalivibrio* wurden insgesamt 1 951 von insge-

samt 3 450 im Genom annotierten Proteine identifiziert und die relativen Häufigkeiten von 1 680 Proteinen quantifiziert (s. Kap. 7.3). Unter den am häufigsten vorkommenden Proteinen war die Schwefel Oxygenase Reduktase (SOR), neben einer von insgesamt drei im Genom codierten FccB's, zu finden. Die Abundanz der SOR war insbesondere in spätexponentiellen und frühstationären Wachstumsphasen erhöht, was darauf hindeutet, dass das Enzym eine wichtige Funktion bei der Oxidation von sowohl frei verfügbaren Schwefel, als auch solchen aus Schwefelkugeln bei Wachstumstemperaturen von 30 °C einnimmt (s. Abb. 7.10). Zusammen mit der SOR besaßen auch Schwefelkugelproteine erhöhte Häufigkeiten, insbesondere wenn *Tv. paradoxus* mit Thiosulfat kultiviert wurde. Die Expression des *sor* Gens und die Bildung des entsprechenden Proteins sind insofern verwunderlich, als dass es sich um ein Protein handelt, dessen optimale Enzymaktivität bei 80 °C liegt (Rühl *et al.*, 2017; siehe Kapitel 4-6 für weitere Details zur SOR aus *Tv. paradoxus*) und daher die Relevanz von SORs für den Schwefelstoffwechsel mesophiler Organismen bisher nur spekulativ war.

### Periplasmatische Sulfid-Oxidation in *Tv. paradoxus*

Während die meisten heterotroph wachsenden Bakterien Sulfid unter aeroben Bedingungen aus Schwefel-beinhaltenden Aminosäuren produzieren (Clarke, 1953, Morra & Dick, 1991, Xia *et al.*, 2017), zählen Sodaseen natürlicherweise zu den Habitaten mit den höchsten Konzentrationen reduzierter Schwefelverbindungen (Sorokin *et al.*, 2015).

In den humanen Mitochondrien wurde zuerst ein sogenannter SQR-PDO Sulfid-Oxidationsweg identifiziert, in dem Mutationen im entsprechenden *pdo* Gen zur infantilen Erkrankung Ethylmalonsäure Enzephalopathie führen (siehe Kapitel 3 für Details zur PDO). In Bakterien verläuft der Sulfid-Oxidationsweg auf ähnliche Weise; die SQR oxidiert Sulfid zu Polysulfid, dieses reagiert entweder spontan mit Glutathion (GSH) zu Glutathion Persulfid (GSSH) oder mittels Rhodanasen in einer schnelleren, Enzym-katalysierten Reaktion (Xin *et al.*, 2016). GSSH wird anschließend von einer PDO zu Sulfit oxidiert, welches wiederum spontan mit Polysulfiden reagiert und Thiosulfat bildet. Neben SQRs sind Fcc-Proteine dazu in der Lage, Sulfid zu oxidieren, wobei deren genaue physiologische Rolle bislang unklar ist. Wie bereits für mehrere FccB-Proteine beschrieben (Ogawa *et al.*, 2010, Gregersen *et al.*, 2011), besitzen auch diejenigen aus *Tv. paradoxus* ein TAT-Signal für den Export in das Periplasma, wobei auch membrangebundene Fcc-Vertreter identifiziert worden sind (Kostanjevecki *et al.*, 2000). Somit liegt der Hauptunterschied der Sulfid-Oxidation im Reaktionsraum: Während die Sulfidoxidation über SQR und PDO im Cytoplasma stattfindet, ist sie bei Fcc-Proteinen auf den periplasmatischen Raum beschränkt. *Al. vinosum* und *Tv. paradoxus* besitzen Gene für beide Enzyme, sowohl SQR als auch FccAB. Eine FccB-Deletionsmutante in *Al. vinosum* zeigte jedoch keine Verringerung der Sulfid-Oxidationsrate und hatte keine Auswirkungen auf das Wachstum, weshalb die SQR in diesem Organismus vermutlich das Haupt-

enzym des initialen cytoplasmatischen Sulfid-Oxidationsschrittes darstellt (Reinartz *et al.*, 1998, Frigaard & Dahl, 2009).

Hohe relative Proteinhäufigkeiten von FccB-Proteinen und auch der SOR im Rahmen der *Tv. paradoxus* Proteomstudie (s. Kap. 7.3) deuten dagegen auf einen periplasmatischen Sulfid-Oxidationsweg über FccAB mit anschließender cytoplasmatischer S<sup>0</sup>-Oxidation über die SOR hin anstelle des in *Al. vinosum* postulierten cytoplasmatischen Oxidationswegs über SQOR/PDO. Die PDO besitzt in *Tv. paradoxus* nur geringe Abundanzen, unabhängig ob der Organismus mit Thiosulfat oder Thiocyanat kultiviert wurde. Dies gilt für die initial identifizierte putative PDO ebenso wie für das im Rahmen der Proteomstudie zusätzlich identifizierte Enzym. Zweiteres weist zwar, insbesondere in Anwesenheit von Thiosulfat, deutlich höhere Proteinmengen auf, die jedoch deutlich unterhalb der SOR liegen. So besitzt die SOR in Anwesenheit von Thiosulfat gegenüber der neu identifizierten PDO  $\log_2 \text{fold changes}$  zwischen 2,5 in frühexponentiellen und 7,3 in spätexponentiellen Wachstumsphasen und mit Thiocyanat konstante  $\log_2 \text{fold changes}$  von  $\approx 5,8$ . Überraschenderweise besaßen zwei der drei FccB's (FccB\_1 und 2; Sequenzidentität untereinander: 48,0 %) ebenfalls stark erhöhte Abundanzen verglichen mit der SQOR, unabhängig von der Wahl der Energiequelle. Die wachstumsphasenabhängigen Änderungen der FccBs entsprachen, vor allem mit Thiosulfat als Elektronendonator, denen der SOR, so dass die FccB-Proteine in *Tv. paradoxus*, im Gegensatz zu Untersuchungen in *Al. vinosum*, womöglich eine übergeordnete Rolle in der Sulfid-Oxidation einnehmen. Dementsprechend erscheint es in *Tv. paradoxus* wahrscheinlich, dass es hauptsächlich zu einer periplasmatischen Sulfid-Oxidation durch FccB-Proteine mit Polysulfid oder S<sup>0</sup> als Reaktionsprodukt kommt (Abb. 7.14). Denkbar ist, dass die großen Mengen des periplasmatischen Schwefels anschließend in Schwefelkugeln gelagert werden und diese durch die SOR im

Cytoplasma zu Sulfit weiteroxidiert werden. Thiosulfat wird vermutlich mittels des unvollständigen Sox-Systems ebenfalls im Periplasma zu  $S^0$  oxidiert und als Schwefelkugel ins Cytoplasma eingelagert. Die cytoplasmatische  $S^0$ -Oxidation erfolgt anschließend über die SOR und/oder oxidativ arbeitende Dsr mit Sulfit als Reaktionsprodukt (Abb. 7.14).

### Indirekte Sulfit-Oxidation über AprAB und Sat

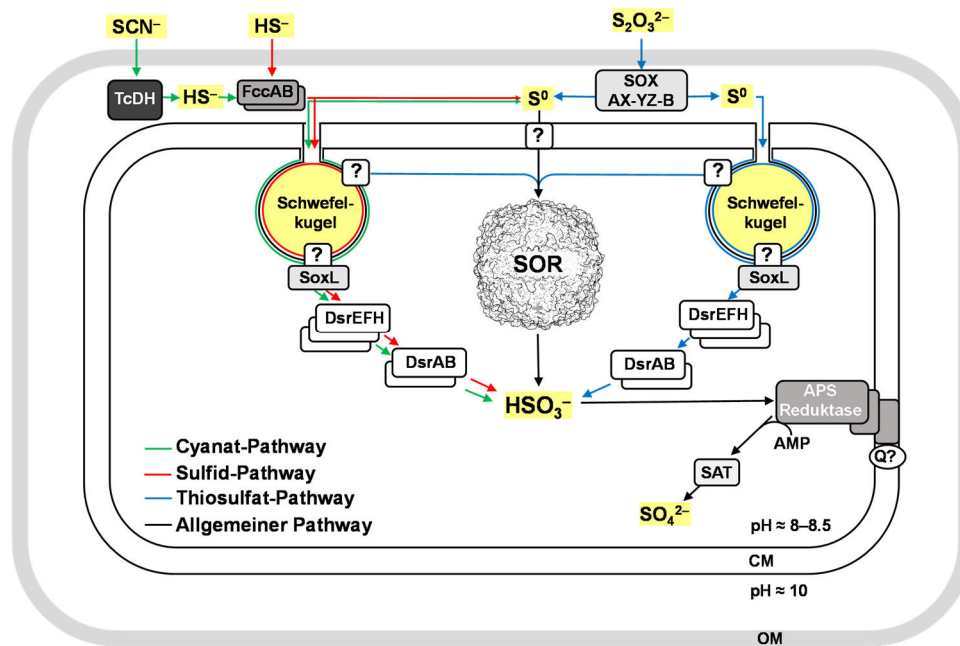
Die indirekte cytoplasmatische Sulfit-Oxidation über Adenosin-5'-Phosphosulfat (APS), katalysiert durch die APS-Reduktase (AprAB) und die ATP-Sulfolase (Sat), ist in vielen violetten und grünen anoxischen, phototrophen Schwefelbakterien ein gängiger Reaktionsweg (Dahl, 1996, Sánchez *et al.*, 2001, Frigaard & Dahl, 2009, Rodriguez *et al.*, 2011, Parey *et al.*, 2013). Dennoch wurden AprAB zunächst lediglich in Sulfatreduzierern gefunden, in denen es die umgekehrte Reaktion katalysiert (Taylor, 1994, Brune, 1995, Hagen & Nelson, 1997). Während der oxidativen Reaktion findet eine Substratstufenphosphorylierung statt, wobei der energetische Nutzen insbesondere für chemolithoautotrophe Bakterien lange unklar blieb (Hempfling & Vishniac, 1967, Peck Jr, 1968, Dahl, 1996).

Proteine der direkten cytoplasmatischen Sulfit-Oxidation (SoeAB) zeigten in der Proteomstudie in allen Wachstumsphasen verringerte Abundanzen gegenüber AprAB und Sat mit durchschnittlichen  $\log_2$  fold changes von  $\approx 5,3$  (AprAB vs. SoeAB) bzw.  $\approx 1,5$  (Sat vs. SoeAB). Demnach erscheint die indirekte Sulfit-Oxidation über eine revers arbeitende APS-Reduktase in *Tv. paradoxus* der wahrscheinlichere Oxidationsweg im Cytoplasma zu sein (Abb. 7.14). In Schwefel-oxidierenden Mikroorganismen wird angenommen, dass ein Chinon-interagierender, membrangebundener Oxidoreduktase-Komplex (QmoABC) als Elektronenakzeptor für die frei werdenden Elektronen während der Bildung von APS dient, insbesondere da *qmoABC* Gene in vielen Schwefeloxidierern gefunden wurden

(Frigaard & Dahl, 2009, Rodriguez *et al.*, 2011). Ein solches System der Sulfit-Oxidation könnte dabei insbesondere für chemolithoautotrophes Wachstum von Vorteil sein, bei dem parallel eine Reduktion von Elektronenakzeptoren mit niedrigem Reduktionspotential, wie Ferredoxin oder  $NAD^+$ , stattfinden könnte. Dies würde entsprechend in einem geringerem Energiebedarf für den Elektronenrückfluss resultieren (Dahl, 2017). Gene für den Qmo-Komplex wurden allerdings in Genomanalysen von *Tv. paradoxus* nicht gefunden, sodass unklar ist, inwiefern die Funktion als Elektronenakzeptor von anderen (Membran-assoziierten) Elektronenakzeptoren übernommen werden kann.

### TcDH und FccB im Thiocyanat-Metabolismus

Wurden *Tv. paradoxus* Zellen mit Thiocyanat kultiviert waren die Wachstumsgeschwindigkeiten und auch die finalen Zelldichten geringer als in Anwesenheit von Thiosulfat. Die Oxidation von Thiocyanat ist dabei kein gängiger Stoffwechselweg in *Thioalkalivibrio* spp. Genomanalysen zeigten, dass lediglich elf von 75 Spezies Gene für die Thiocyanat-Oxidation besitzen (Berben *et al.*, 2019). *Tv. paradoxus* nutzt für seinen Thiocyanat-Metabolismus den so genannten „Cyanat-Weg“, wie die meisten anderen *Thioalkalivibrio*-Vertreter. Bei diesem Stoffwechselweg werden Cytochrom c und Sauerstoff als terminale Elektronenakzeptoren genutzt (Sorokin *et al.*, 2001). Transkriptom-Analysen verdeutlichten, dass im Vergleich zur Kultivierung mit Thiosulfat eine Vielzahl von Genen deutliche Unterschiede in ihren relativen Transkriptmengen aufwiesen (Berben *et al.*, 2017a). Das entsprechende Gencluster beinhaltet unter anderem Gene für eine putative Kupferaufnahme (*copCD*), ein ABC-Transportsystem, *FccAB\_3* und einem Zwei-Komponenten-Regulationssystem ( $\sigma^{54}$ -abhängiger Fis-Regulator; Abb. 7.12). Die Beobachtungen der Zunahme von Transkripten im Kultivierungsverlauf mit Thiocyanat korreliert mit den Re-



**Abbildung 7.14** | Darstellung von Schwefeloxidations-pathways in *Tv. paradoxus* ARh1 auf Basis von Proteinabundanzen der Proteomstudie. CM, Cytoplasmamembran; OM, Äußere Membran (outer membrane).

sultaten der hier durchgeführten Proteomanalyse, die eine grundlegend differentielle Proteinzusammensetzung in Thiosulfat- vs. Thiocyanat-Kulturen zeigte (s. Kap. 7.3, Abb. 7.7). Am stärksten betroffen war ein Gencluster, in dem unter anderem Gene für die TcDH und einer Flavocytochrom *c* Sulfid Dehydrogenase (FccB\_3) lokalisiert sind (s. Kap. 7.3, Abb. 7.12 und 7.13). In Anwesenheit von Thiocyanat waren die Abundanzen der TcDH und von FccB\_3 am deutlichsten im Vergleich zu Thiosulfat-Kulturen erhöht, was auf die Relevanz der beiden Proteine, aus dem Operon-ähnlichen Gencluster im Genom, für den Thiocyanat-Metabolismus hindeutet. Innerhalb des Genclusters ist mit CopC unter anderem ein Kupferbindeprotein enthalten, welches ebenfalls in Anwesenheit von Thiocyanat signifikant erhöhte Abundanzen besitzt. Dies könnte in direkten Zusammenhang mit der erhöhten Produktion von TcDH stehen, da zunächst gezeigt wurde, dass das Protein nur aktiv ist, wenn es Kupfer als Co-Faktor bindet und die aktuell veröffentlichte 3D-Struktur entsprechend drei Kupferzentren aufweist (Tsallagov *et al.*, 2015, Tikhonova *et al.*, 2020). Biochemische Untersuchungen zeigten zudem, dass

die TcDH für die direkte Thiocyanat-Umwandlung zu Cyanat, S⁰/HS⁻ und zwei reduzierenden Äquivalenten ohne Beteiligung von O₂ verantwortlich ist und damit maßgeblich an der periplasmatischen Schwefelbildung beteiligt zu sein scheint. Darüber hinaus wurde kürzlich die Proteinstruktur des CopC-FccAB-Proteinkomplexes aus *Tv. paradoxus* veröffentlicht (beide Proteine befinden sich innerhalb des TcDH-Genclusters), dessen biochemische Aktivität allerdings nicht untersucht wurde (Osipov *et al.*, 2018), weshalb sowohl der Mechanismus, als auch die Beteiligung weiterer Proteinkomplexe an der Thiocyanat-Umwandlung weiterhin in vielen Teilen unverstanden ist. Aufgrund eines N-terminalen Signalpeptids (*tat*-System) der TcDH und der Flavocytochrom *c* Sulfid Dehydrogenase (FccB\_3) ist es jedoch höchstwahrscheinlich, dass die Thiocyanat- und die nachfolgende Schwefeloxidation im Periplasma von *Tv. paradoxus* stattfindet (Abb. 7.14), wobei periplasmatisch gebildeter Schwefel als Schwefelkugeln eingelagert und anschließend cytoplasmatisch, analog zur Thiosulfat-Oxidation, weiter metabolisiert werden kann.

# KAPITEL 8

---

## Schlussfolgerungen und Ausblick

Die vorliegende Arbeit hatte zum Ziel, zwei Vertreter Schwefel-oxidierender Enzyme, die Schwefel Oxygenase Reduktase (SOR) und die Persulfid Dioxygenase (PDO), biochemisch, spektroskopisch und strukturell zu charakterisieren. Die Ergebnisse sollten Rückschlüsse auf die zugrundeliegenden Funktionsweisen und die Reaktionsmechanismen beider Enzymklassen zulassen. Beide Enzyme haben gemein, dass sie Sulfanschwefel oxidieren, SORs in einer gekoppelten Schwefel-Disproportionierungsreaktion mit Polysulfid als Substrat und Sulfit sowie Sulfid als Reaktionsprodukte und PDOs in einer Oxygenase-Reaktion mit Glutathion Persulfid (GSSH) als Substrat und Sulfit und reduziertem Glutathion (GSH) als Reaktionsprodukte. Beide Reaktionen werden an mononuklearen nicht-Häm Eisenatomen, welche in oktaedrischen Koordinationssphären ligiert sind, katalysiert. Der grundlegende Aufbau der beiden Holoenzyme unterscheidet sich jedoch signifikant.

SORs bilden große, kugelförmige Enzyme aus 24 identischen Untereinheiten, mit hohler innerer Kavität und molekularen Massen von ca. 845 kDa. Aufgrund des komplexen Aufbaus von SORs beruhten bislang postulierte Substrat- und Produkttrouten lediglich auf visuellen Beobachtungen von Poren und Kavitäten in den jeweiligen Röntgenkristallstrukturen (Urich *et al.*, 2006, Veith *et al.*, 2011). Software-gestützte Tunnelanalysen, sowohl von AaSOR und HnSOR 3D-Strukturen, als auch in der hier neu aufgeklärten 3D-Struktur der TpSOR, ergaben ein in SORs universell anwendbares Bild von möglichen Substrat- und Produkttrouten, in denen die Tetramer- und Trimerkanäle den jeweiligen Substrateingang bzw. Produktausgang des Holoenzym darstellen. Interessanterweise scheint es so, dass die in der AaSOR und HnSOR hauptsächlich von Methioninen gebildete Pore, die ursprünglich als Eingang zur *active site pocket* definiert wurde, eher einen Ausgang der polaren Reaktionsprodukte darstellt. Vielmehr erscheint es wahrscheinlich, dass das Substrat über einen weiteren Kanal, der über eine

zweite Kavität und dem für SORs essentiellen und meist persulfurierten Cystein mit dem aktiven Zentrum verbunden ist, das katalytische Eisenzentrum erreicht. Der Kanal wurde ursprünglich als Zink-Kanal beschrieben, da sich in Röntgenkristallstrukturen gezeigt hatte, dass nach Zink-Inkubation ein inhibitorisches  $\text{Zn}^{2+}$ -Ion pro Untereinheit in der Tasche gebunden war (Veith *et al.*, 2011). Überraschenderweise wurde in Kryo-EM-Strukturen der AaSOR und TpSOR, die im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit aufgeklärt wurden, auch im nativen Zustand Elektronendichte identifiziert, die eine Metallbindung in dieser Kavität nahelegt, wobei die chemische Natur der Elektronendichte und deren Funktion ungeklärt blieben. Die Beobachtungen verdeutlichen eine womöglich wichtigere Rolle des Zn/Css-Kanals für die Enzymaktivität als ursprünglich angenommen, weshalb der Kanal als denkbarer Hauptsubstratweg mit zusätzlichem Metallbindungszentrum im Fokus weiterer Analysen stehen sollte.

Im Vergleich zu den voluminösen SORs bilden PDOs vergleichsweise kleine Enzyme, die sich meist aus einem Homodimer mit molekularen Massen von ca. 54 kDa zusammensetzen. Im Gegensatz zu vielen bislang charakterisierten PDOs liegt die AcPDO in Lösung hauptsächlich als Homotetramer vor. Dies zeigten sowohl chromatographische Analysen, als auch die Anordnung des Proteins im Proteinkristall. Die Tetramerisierung in letzterem wird höchstwahrscheinlich durch das Zusammenspiel von Oberflächenladungen und hydrophoben Interaktionen vermittelt, wobei beides gängige Oligomerisierungsmechanismen in Proteinen darstellen (Jones & Thornton, 1996, Zhao *et al.*, 2011, Chanhai *et al.*, 2015). Substitutionen der vermeintlich an der Tetramerisierung beteiligten Aminosäuren resultierten in reduzierten hydrodynamischen Volumina der Holoenzyme, die eher für AcPDO-Trimer als -Tetramere sprachen, wobei die genaue Ursache hierfür unklar blieb (Panthel, 2019). Es ist jedoch wahrscheinlich, dass nicht nur eine, sondern die Kombination



verschiedener Aminosäuren für die Tetramerisierung der AcPDO verantwortlich und eine weitreichendere Mutagenese von oberflächenassoziierten Aminosäuren an der Tetramerschnittstelle nötig ist, um ein biologisch aktives AcPDO Dimer zu erhalten und damit die tatsächlichen Gründe für die Tetramerisierung der AcPDO im Vergleich zu anderen PDOs aufzuklären.

Die Forschung an PDOs wurde in den letzten 15 Jahren intensiviert, seitdem herausgefunden worden war, dass die autosomal-rezessive Erbkrankheit Ethylmalonsäure Enzephalopathie (EE) in direktem Zusammenhang mit Mutationen der humanen Persulfid Dioxygenase (hETHE1) steht (Tiranti *et al.*, 2004). Im Rahmen der hier durchgeführten Arbeit wurde eine umfassende Mutagenesestudie mit der bakteriellen AcPDO durchgeführt (50 % Sequenzidentität zum hETHE1). Hierbei wurden einige Aminosäuren identifiziert, deren Substitution einen starken Abfall der Enzymaktivität bewirkte (< 95 % im Vergleich zum Wildtyp). Einige von ihnen sind dafür bekannt, dass der Austausch der menschlichen Homologe EE auslöst, darunter AcPDO-T<sub>114</sub> und insbesondere AcPDO-R<sub>139</sub>. Alanin-Varianten beider Aminosäuren resultierten in 0,9 bzw. 0,5 % Restaktivität. R<sub>139</sub> befindet sich in der *active site pocket* von PDOs und Bindungsanalysen deuten darauf hin, dass die Aminosäure essentiell für die Substratbindung ist. Darüber hinaus wurden neun weitere Aminosäuren ermittelt, die alle essentiell für die Enzymaktivität sind, wobei bei einigen von ihnen unklar blieb, wie und warum sie die Enzymaktivität derart drastisch beeinflussen, sodass deren Rolle in zukünftigen Untersuchungen im Hinblick auf ihre Substratbindungseigenschaften und Proteinstabilitäten ermittelt werden sollte.

Unter ihnen befinden sich zwei Cysteine (C<sub>87</sub> und C<sub>224</sub>), die sich an der äußeren Enzymoberfläche in einem beträchtlichen Abstand von > 16 Å zum aktiven Zentrum befinden. AcPDO-C<sub>224</sub> ist in Typ I-PDOs konserviert und wurde für das hETHE1 (C<sub>247</sub>) als polysul-

fidiert beschrieben (Jung *et al.*, 2016). Die Alanin-Variante von hETHE1-C<sub>247</sub> wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit erstellt und zeigte überraschenderweise weniger starke Auswirkungen auf die Enzymaktivität als die C<sub>224</sub>A-Variante der AcPDO (18,0 vs. 1,1 % Restaktivität), blieb jedoch auf dem Niveau der C<sub>247</sub>S-Variante, welche von Jung *et al.* (2016) charakterisiert worden war. Die Röntgenkristallstruktur und MalPEG-Gel-Shift Assays zeigten, dass beide benachbarten Cysteine der AcPDO eine redoxaktive Disulfidbrücke ausbilden. Darüber hinaus wiesen C<sub>87</sub>A- bzw. C<sub>224</sub>A-Varianten nach Inkubation mit GS(S)H eine Glutathionylierung am jeweils verbleibenden Cystein auf. Massenspektrometrische (MS) Analysen des hETHE1 im Rahmen dieser Arbeit sollten klären, ob es sich bei den beschriebenen C<sub>247</sub>-Modifikationen im hETHE1 tatsächlich um eine Polysulfidierung handelt oder ob die Modifikationen auch auf eine Protein-S-Glutathionylierung zurückzuführen ist. Entsprechende Untersuchungen des hETHE1-Holoenzym zeigten, dass – analog zu den Ergebnissen der AcPDO – nach GS(S)H-Inkubation ebenfalls Massenschiebungen des nativen Proteins vorhanden waren, welche der molekularen Masse von einem oder zwei Glutathionmolekülen entsprachen. MS-Analysen von hETHE1-Peptiden, welche ebenfalls im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt wurden, gaben jedoch keinen endgültigen Aufschluss über die Position der Modifikation, da das entsprechende Peptid in den Quantifizierungen unterrepräsentiert blieb (nicht gezeigt). Weitere Peptid-basierte Analysen sollten jedoch das Ziel haben, die genaue Position der Glutathionylierung im hETHE1 zu bestimmen. Die Protein-S-Glutathionylierung ist vermutlich (i) auf oxidative Schutzmechanismen zurückzuführen, wie sie für viele andere Proteine beschrieben sind (Dalle-Donne *et al.*, 2009) und könnte darüber hinaus (ii) an wichtigen Stabilisierungen des Proteins beteiligt sein. Glutathionyliertes hETHE1-C<sub>247</sub> könnte demnach über eine Interaktion der GSH-Glutamyl- und

-Glycin-Anteile mit starren Sekundärstrukturelementen des restlichen Enzyms die Funktion der AcPDO-Disulfidbrücke im nativen Zustand übernehmen. Diese koordiniert über das konservierte AcPDO-N<sub>221</sub> einen *active site loop*, in dem sich mit den ebenfalls konservierten D<sub>61</sub> und H<sub>62</sub> zwei essentielle Aminosäurereste befinden (verbleibende Enzymaktivität der Alanin-Varianten < 0,05 %). Zusammen mit dem ebenfalls konservierten und essentiellen H<sub>171</sub> scheinen die Aminosäurereste mittels Säure-Base katalysierten Protonen-*Shuffling* direkt an der Katalyse am aktiven Eisenzentrum beteiligt zu sein. Ein ähnlicher Mechanismus wurde bereits für die O-O-Aktivierung in Bleomycin auf Basis quantenphysikalischer Dichtefunktionaltheorie (DFT) vorgeschlagen (Kumar *et al.*, 2006). Ein Nachweis über die Funktion der Protonen während der Katalyse sollte im Weiteren mit <sup>1</sup>H-NMR erfolgen, wobei erste NMR-Spektren mit der nativen AcPDO vielversprechend verliefen (nicht gezeigt).

Das katalytische Eisen besitzt in der AcPDO ein negatives Reduktionspotential von -234 mV, ist jedoch  $\approx$  40 mV positiver als das des hETHE1 (Henriques *et al.*, 2014). Mittels UV-Vis- und *Stopped Flow*-Spektroskopie wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit Fe-O<sub>2</sub> und Fe-O<sub>2</sub>-SR-Übergangszustände am Eisenzentrum der AcPDO identifiziert, inklusive eines putativen Fe(IV)-Intermediates, welches in den bisher veröffentlichten PDO-Reaktionsmechanismen nicht in Betracht gezogen worden war (Kabil & Banerjee, 2012, Kabil *et al.*, 2018). Für einige andere nicht-Häm Eisen-Oxygenasen wurde dagegen bereits gezeigt, dass Fe(IV)-Intermediate wichtige Bestandteile ihres Reaktionsmechanismus sind (Price *et al.*, 2003, Tchesnokov *et al.*, 2016, Villar-Acevedo *et al.*, 2017). Längere Inkubationen (> 2 h) konzentrierter AcPDO-GSSH-Gemische resultierten in einen stabilen grünen Komplex mit einem spezifischen Absorptionsmuster, welches auf ein robustes Peroxid-Intermediat hinweisen könnte (Coggins *et al.*, 2013). Nach Struktur-basier-

tem GSSH-Docking mit simultaner Energieminimierung der AcPDO Kristallstruktur verlässt interessanterweise das zentrale, Eisen-koordinierende Wassermolekül seine Bindungsstelle und begibt sich in eine kleine Tasche, die hauptsächlich von D<sub>61</sub>, H<sub>62</sub> und H<sub>171</sub> gebildet wird. In der Folge befindet es sich in unmittelbarer Nähe zu einem zweiten Eisen-koordinierenden Wassermolekül (Abstand: 2,1 Å), sodass beide als Peroxid modelliert werden konnten und der resultierende AcPDO-GSSH-Sox-Komplex als strukturelle Basis für die Untersuchung von AcPDO-Reaktionsintermediaten dienen könnte. Es bedarf jedoch weiterer Charakterisierungen der Zwischenzustände, um abschließende Aussagen über die in dieser Arbeit beobachteten (stabilen) Übergangszustände treffen zu können. Hierfür bieten sich DFT-Berechnungen ebenso wie Mößbauer- oder Resonanz-Raman-Spektroskopie an. Darüber hinaus sollte der Fokus auf der Proteinkristallisation des in Lösung stabilen grünen AcPDO-GSSH-Komplexes liegen, um die vorliegende Bindung und mögliche Zwischenzustände während der Katalyse auf struktureller Ebene im Detail zu charakterisieren.

Ein weiterer Fokus lag in dieser Arbeit auf der Untersuchung von SORs. Vertreter dieser Enzymfamilie wurden ursprünglich ausschließlich in thermoacidophilen, Schwefeloxidierenden Archaea gefunden. Erst später wurden *sor* Gene in den Genomen von thermophilen und mesophilen Bakterien identifiziert. Vor kurzem wurden entsprechende Gene ebenfalls in Vertretern der Gattung *Thioalkalivibrio* gefunden, wobei Vergleiche der Proteinsequenzen zeigten, dass eine von insgesamt zwei SORs aus *Tv. nitratireducens*, zusammen mit der aus *Tv. paradoxus* (TpSOR), im phylogenetischen Protein-stammbaum tiefst abzweigend sind und eine Sequenzidentität von lediglich 29-34 % im Vergleich zu allen anderen SORs besitzen. Es stellte sich daher die Frage, ob tiefst abzweigende SORs weiterhin eine typische SOR-Aktivität besitzen oder ob die Aufteilung im phylogenetischen Dendrogramm auf die Entwick-

lung paraloger SOR-Untergruppen zurückzuführen ist. Erste Aktivitätsmessungen der *TpSOR* hatten gezeigt, dass die *TpSOR*, obwohl der Organismus optimalerweise zwischen 30 und 37 °C wächst, ein Temperaturoptimum von 80 °C besitzt und sich damit im Bereich anderer, bereits charakterisierter SORs befindet (Rühl, 2015). Aufgrund der deutlichen Unterschiede zwischen Wachstumstemperatur des Organismus und Temperaturoptimum der *TpSOR* war zunächst unklar, inwiefern das Enzym eine nachvollziehbare physiologische Rolle in *Tv. paradoxus* einnimmt. Eine globale Proteomstudie zeigte, dass die *TpSOR* vor allem in exponentiellen Wachstumsphasen gebildet wird und eng mit der intrazellulären Einlagerung von elementarem Schwefel zusammenhängt. Damit wurde erstmals gezeigt, dass SORs in mesophilen Mikroorganismen in signifikant hohen Mengen im natürlichen Wirt produziert werden. Bislang war ihre Bildung lediglich auf den Nachweis in den hyperthermophilen Archaea *Ac. ambivalens* und *Ac. brierleyi* beschränkt, aus denen das jeweilige Enzym homolog gereinigt worden war (Emmel *et al.*, 1986, Kletzin, 1989). Eine Anpassung an die mesophile Lebensweise von SORs könnte auf ihre, im Vergleich zu den archaealen Vertretern, relativ hohe Aktivität bei niedrigen Reaktionstemperaturen und auf ein komplexeres Tunnelnetzwerk mit einer höheren Anzahl Verbindungen zur äußeren Proteinoberfläche zurückzuführen sein. Demnach besitzen SORs in Mesophilen ebenfalls eine physiologische Rolle, wobei die *TpSOR*, zusammen mit einer oxidativ arbeitenden Dsr- und FccB-Proteinen, eine zentrale Rolle im oxidativen Schwefelstoffwechsel von *Tv. paradoxus* einnimmt. PDOs scheinen dagegen eine untergeordnete Rolle im dissimilatorischen Schwefelstoffwechsel solcher Organismen zu besitzen und könnten demnach eher an der Aufrechterhaltung des Redox-Gleichgewichts im Cytoplasma mitbeteiligt sein. Um die Funktion der einzelnen (zentralen) Proteine des Schwefelstoffwechsels in *Tv. paradoxus* genauer zu

charakterisieren, würden sich genetische *Knock-Out*-Experimente anbieten, wobei zurzeit noch kein allgemein anwendbares System zur genetischen Manipulation von *Thioalkalivibrio spp.* existiert.

Biochemische Untersuchungen der *TpSOR* zeigten auf Basis kolorimetrischer Quantifizierungen der Reaktionsprodukte, dass sie im Gegensatz zu anderen SORs eine untypisch geringe Reduktase-Aktivität besitzt. Um die Produktstöchiometrien von SORs, unabhängig von möglichen Interferenzen der Reaktionsprodukte in den kolorimetrischen Nachweisen, zu bestimmen, wurde im Rahmen dieser Arbeit ein HPLC-gekoppelter Enzymaktivitätstest entwickelt. In dessen Zuge wurden die Reaktionsprodukte unmittelbar nach der Enzymreaktion an den Fluoreszenzfarbstoff Monobrombiman gekoppelt und anschließend chromatographisch quantifiziert. Die Analysen ergaben für *AaSOR* und *HnSOR* eine Stöchiometrie oxidiert zu reduzierter Reaktionsprodukte von nahezu 1: 1 und bestätigen damit die erwarteten Verhältnisse aus der Schwefeldisproportionierung (Kletzin, 1989). Zwar wurde, im Gegensatz zum kolorimetrischen Standardverfahren zur Sulfidbestimmung, mit Hilfe der HPLC-gekoppelten Nachweismethode Sulfid als Reaktionsprodukt der *TpSOR* detektiert und quantifiziert, jedoch betrug das Verhältnis zwischen oxidierten und reduzierten Reaktionsprodukten 30: 1, bei einer im Vergleich zu den anderen SORs fünfmal höheren Oxygenase-Aktivität. Um mögliche Ursachen für die Verschiebung von Reduktase- zu Oxygenase-Aktivität zu ermitteln, wurde die 3D-Struktur der *TpSOR* aufgeklärt und analysiert.

Diese besitzt einen mit anderen SORs vergleichbaren Aufbau des Holoenzym, wobei das „kantigere“ Erscheinungsbild aus der Umlagerung der verlängerten N-Termini resultiert. Signifikante Unterschiede zu anderen SORs ergaben sich jedoch beim vorliegenden Redoxzustand des Eisens, welcher in der *TpSOR* nach der Katalyse oxidiert vorlag, wohingegen in der *AaSOR* gegenteilige Effekte

beobachtet worden waren (Urich, 2005). Darüber hinaus weist die *TpSOR* beträchtliche strukturelle Abweichungen der *active site pocket* auf. Diese ist in der *TpSOR* durch einen interhelikalen, flexiblen *loop* einer strukturgebenden  $\alpha$ -Helix in unmittelbarer Nähe zum aktiven Zentrum unterbrochen. Der Zustand wurde sowohl in Röntgenkristallstrukturen als auch in unabhängig davon erstellten Kryo-EM-Strukturen vorgefunden und scheint demnach kein Artefakt des langsamen Kristallisationsprozesses zu sein. Flexible *loops* sind ebenfalls in einigen anderen aktiven Zentren beschrieben worden und scheinen dort eine wichtige Funktion für die entsprechende Enzymaktivität einzunehmen (Tanaka *et al.*, 1992, McElheny *et al.*, 2005, Montagner *et al.*, 2016). Interessanterweise sorgt die Bewegung eines flexiblen *loops* in der Glutathion Synthetase aus *E. coli* dafür, dass die Bindungstasche während der Reaktion einen abgeschlossenen Reaktionsraum bildet, um instabile Intermediate zu schützen (Tanaka *et al.*, 1992). Ein ähnlicher Mechanismus wäre auch für die *TpSOR* denkbar, in der die Bewegung des *loops* das Substrat für die Katalyse eng umschließen könnte und so, im Gegensatz zu den geräumigen Substratbindungstaschen anderer SORs, eine kleine, passgenaue Reaktionskammer bildet, die vor Oxidation/Reduktion des Substrats, der Reaktionsprodukte und/oder möglicher Reaktionsintermediate schützt. Rückschlüsse auf die Funktion des *active site loops* für die Enzymreaktion in der *TpSOR* könnten Mutagenesestudien zulassen, in denen die beteiligten Aminosäuren (sukzessive) an den vorliegenden Zustand der *AaSOR/HnSOR* angepasst werden. Eine weitere Möglichkeit stellt die Erstellung synthetischer Gene dar, in denen alle an den aktiven Zentren in *AaSOR/HnSOR* und *TpSOR* beteiligten Aminosäuren ausgetauscht werden mit anschließender biochemischer und struktureller Charakterisierung der Proteine.

Die beiden benachbarten, in allen SORs konservierten Cysteine besitzen in der *TpSOR*

signifikant höhere Distanzen zum aktiven Zentrum als in allen anderen SORs. Mutagenesestudien im Rahmen dieser Arbeit zeigten, dass beide, sowohl in *TpSOR* als auch *HnSOR*, einen größeren Beitrag zur Enzymaktivität leisten als in ersten Studien der homologen Cysteine in der *AaSOR* vermutet (Urich *et al.*, 2005b). In der Röntgenkristallstruktur der *HnSOR* besaßen beide Reste zusätzliche Elektronendichte, welche auf Schwefeladdukte zurückzuführen waren (Pöll, 2016). In einer Kryo-EM-Struktur der *AaSOR*, welche in der vorliegenden Arbeit aufgeklärt wurde, war ebenfalls zusätzliche Elektronendichte zwischen beiden Cysteinen sichtbar, was auf die Ausbildung von Tri- oder Tetrasulfidbrücken zurückzuführen sein könnte. Entsprechend erscheint es wahrscheinlich, dass beide Cysteine an Schwefel-Polymerisations-/Depolymerisationsreaktionen beteiligt sind und damit direkt die Enzymaktivität modulieren. In diesem Zusammenhang erscheint es möglich, dass eine bestimmte Länge der Polysulfidkette für die Katalyse begünstigt wird, welche durch die Reaktionen an den beiden benachbarten Cysteinen determiniert wird. Rückschlüsse hierauf könnte der HPLC-basierte Enzymtest zulassen. Erste Trennungen von chemisch hergestellten Polysulfidgemischen verliefen aussichtsreich und bedürfen weiterer massenspektrometrischer Charakterisierungen, um die Länge der Polysulfidketten der einzelnen chromatographischen Retentionspeaks zu bestimmen. Anschließend wäre es möglich zu ermitteln, ob SORs bestimmte Längen der Polysulfidkette als Substrat begünstigen und welchen Einfluss sie, zusammen mit entsprechenden Cystein-Varianten, auf die Enzymaktivität besitzen.

Sowohl SORs als auch PDOs besitzen mit einer 2-His-1-Carboxylat-Triade ein für nicht-Häm Eisen-Oxygenasen typisches Eisenkoordinationsmotiv, welches jedoch leicht voneinander abweicht. Während PDOs klassischerweise zwei Histidin- und einen einzähnigen Aspartat-Liganden besitzen, weisen SORs

eine deformierte Eisenkoordinationssphäre auf, in der Glutamat zwei Eisenbindungsstellen besetzt. Demzufolge gehen in PDOs drei und in SORs zwei Wassermoleküle eine Eisenbindung ein um die oktaedrische Koordinationssphäre beider Enzyme zu komplettieren. Für die Fe-S-Bindung muss jeweils eines der Wassermoleküle ersetzt werden, wobei ein zweites Wassermolekül die Bindungsstelle für Sauerstoff freigibt. Trotz Katalyse von Schwefelgruppen in ihren aktiven Zentren unterscheiden sich die jeweils verwendeten Substrate deutlich, was sich ebenfalls in den Strukturen widerspiegelt. SORs katalysieren die Reaktion anorganischer Polysulfide, meist in geräumigen Kavitäten, die tief im Enzyminneren verborgen sind. Die Passage voluminöserer Verbindungen scheitert dabei allein schon aufgrund der meist engen und schma-

len Kanäle, was eine hohe Substratspezifität in SORs nahelegt. Dagegen besitzen PDOs frei zugängliche Bindungstaschen, welche ebenfalls große Substrate binden können und demnach anpassbar an andere Persulfid-beinhaltende Verbindungen und niedermolekulare Thiole wie Coenzym A sind. Eine von Typ-I PDOs abweichende Substratspezifität wurde dabei bereits für eine Typ-III PDO gezeigt, wobei die molekulare Ursache hierfür ungeklärt ist (Shen *et al.*, 2015).

Zusammenfassend ergibt dies ein deutlich voneinander abweichendes Bild der katalytischen Zentren von SORs und PDOs, in denen lediglich die Eisenkoordination und das in beiden Fällen vergleichbar niedrige Reduktionspotential eine Gemeinsamkeit beider Enzymklassen darstellt.

---

# Literaturverzeichnis

---

- Adams PD., Afonine PV., Bunkóczi G., *et al.* (2010) PHENIX: a comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, **66**: (2), 213-221. <https://doi.org/10.1107/S0907444909052925>.
- Afonine PV., Grosse-Kunstleve RW., Urzhumtsev A. & Adams PD. (2009) Automatic multiple-zone rigid-body refinement with a large convergence radius. *J Appl Crystallogr*, **42**: (4), 607-615. <https://doi.org/10.1107/S0021889809023528>.
- Afonine PV., Grosse-Kunstleve RW., Echols N., Headd JJ., Moriarty NW., Mustyakimov M., Terwilliger TC., Urzhumtsev A., Zwart PH. & Adams PD. (2012) Towards automated crystallographic structure refinement with phenix.refine. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, **68**: (Pt 4), 352-367. <https://doi.org/10.1107/S0907444912001308>.
- Afonine PV., Poon BK., Read RJ., Sobolev OV., Terwilliger TC., Urzhumtsev A. & Adams PD. (2018) Real-space refinement in PHENIX for cryo-EM and crystallography. *Acta Crystallogr D Struct Biol*, **74**: (Pt 6), 531-544. <https://doi.org/10.1107/S2059798318006551>.
- Almagro Armenteros JJ., Tsirigos KD., Sønderby CK., Petersen TN., Winther O., Brunak S., von Heijne G. & Nielsen H. (2019) SignalP 5.0 improves signal peptide predictions using deep neural networks. *Nat Biotechnol*, **37**: (4), 420-423. <https://doi.org/10.1038/s41587-019-0036-z>.
- Amaro AM., Hallberg KB., Lindström EB. & Jerez CA. (1994) An immunological assay for detection and enumeration of thermophilic biomining microorganisms. *Appl Environ Microbiol*, **60**: (9), 3470-3473. <https://aem.asm.org/content/60/9/3470>
- Atanassov I. & Urlaub H. (2013) Increased proteome coverage by combining PAGE and peptide isoelectric focusing: comparative study of gel-based separation approaches. *Proteomics*, **13**: (20), 2947-2955. <https://doi.org/10.1002/pmic.201300035>.
- Baker NA., Sept D., Joseph S., Holst MJ. & McCammon JA. (2001) Electrostatics of nanosystems: application to microtubules and the ribosome. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**: (18), 10037-10041. <https://doi.org/10.1073/pnas.181342398>.
- Balland V., Banse F., Anxolabéhère-Mallart E., Ghiladi M., Mattioli TA., Philouze C., Blondin G. & Girerd JJ. (2003) Fe(II) and Fe(III) mononuclear complexes with a pentadentate ligand built on the 1,3-diaminopropane unit. Structures and spectroscopic and electrochemical properties. Reaction with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. *Inorg Chem*, **42**: (7), 2470-2477. <https://doi.org/10.1021/ic025905n>.
- Banciu H., Sorokin DY., Rijpstra WI., Sinninghe Damsté JS., Galinski EA., Takaichi S., Muyzer G. & Kuenen JG. (2005) Fatty acid, compatible solute and pigment composition of obligately chemolithoautotrophic alkaliphilic sulfur-oxidizing bacteria from soda lakes. *FEMS Microbiol Lett*, **243**: (1), 181-187. <https://doi.org/10.1016/j.femsle.2004.12.004>.
- Bandeiras TM., Refojo PN., Todorovic S., Murgida DH., Hildebrandt P., Bauer C., Pereira MM., Kletzin A. & Teixeira M. (2009) The cytochrome *ba* complex from the thermoacidophilic crenarchaeote *Acidianus ambivalens* is an analog of *bc*(1) complexes. *Biochim Biophys Acta*, **1787**: (1), 37-45. <https://doi.org/10.1016/j.bbambio.2008.09.009>.
- Bashford D. (1997) An object-oriented programming suite for electrostatic effects in biological molecules. An experience report on the MEAD project. *International Conference on Computing in Object-Oriented Parallel Environments*, 233-240. [https://link.springer.com/chapter/10.1007/3-540-63827-X\\_66](https://link.springer.com/chapter/10.1007/3-540-63827-X_66)
- Beadle BM., McGovern SL., Patera A. & Shoichet BK. (1999) Functional analyses of AmpC  $\beta$ -lactamase through differential stability. *Protein Sci*, **8**: (9), 1816-1824. <https://doi.org/10.1110/ps.8.9.1816>.
- Becker J. (2016) Charakterisierung von Varianten Schwefel-oxidierender Enzyme. *Master-Thesis*, Technische Universität Darmstadt.
- Benjamini Y. & Hochberg Y. (1995) Controlling the False Discovery Rate - a Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. *J R Stat Soc B*, **57**: (1), 289-300. <https://www.jstor.org/stable/2346101?seq=1>
- Berben T., Sorokin DY., Ivanova N., Pati A., Kyrpides N., Goodwin LA., Woyke T. & Muyzer G. (2015) Complete genome sequence of *Thioalkalivibrio paradoxus* type strain ARh 1(T), an obligately chemolithoautotrophic haloalkaliphilic sulfur-oxidizing bacterium isolated from a Kenyan soda lake. *Stand Genomic Sci*, **10**, 105. <https://doi.org/10.1186/s40793-015-0097-7>
- Berben T., Balkema C., Sorokin DY. & Muyzer G. (2017a) Analysis of the Genes Involved in Thiocyanate Oxidation during Growth in Continuous Culture of the Haloalkaliphilic Sulfur-Oxidizing Bacterium *Thioalkalivibrio thiocyanoxidans* ARh 2<sup>T</sup> Using Transcriptomics. *mSystems*, **2**: (6), e00102-00117. <https://doi.org/10.1128/mSystems.00102-17>.
- Berben T., Overmars L., Sorokin DY. & Muyzer G. (2017b) Comparative Genome Analysis of Three Thiocyanate Oxidizing *Thioalkalivibrio* Species Isolated from Soda Lakes. *Front Microbiol*, **8**, 254. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00254>.



- Berben T. (2019)** Comparative analysis of sulfur oxidation pathways in haloalkaliphilic thiocyanate-utilizing species of the genus *Thioalkalivibrio*. *Dissertation*, Universität von Amsterdam, Amsterdam.  
<https://dare.uva.nl/search?identifier=76c10c9a-0248-4d09-ae7d-995304e77e54>
- Berben T., Overmars L., Sorokin DY. & Muyzer G. (2019)** Diversity and Distribution of Sulfur Oxidation-Related Genes in *Thioalkalivibrio*, a Genus of Chemolithoautotrophic and Haloalkaliphilic Sulfur-Oxidizing Bacteria. *Front Microbiol*, **10**: (160),  
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00160>.
- Bouchal P., Zdráhal Z., Helánová S., Janiczek O., Hallberg KB. & Mandl M. (2006)** Proteomic and bioinformatic analysis of iron- and sulfur-oxidizing *Acidithiobacillus ferrooxidans* using immobilized pH gradients and mass spectrometry. *Proteomics*, **6**: (15), 4278-4285.  
<https://doi.org/10.1002/pmic.200500719>.
- Boulegue J. (1978)** Solubility of Elemental Sulfur in Water at 298 K. *Phosphorus Sulfur*, **5**: (1), 127-128.  
<https://doi.org/10.1080/03086647808069875>.
- Bowles MW., Mogollon JM., Kasten S., Zabel M. & Hinrichs KU. (2014)** Global rates of marine sulfate reduction and implications for sub-sea-floor metabolic activities. *Science*, **344**: (6186), 889-891.  
<https://doi.org/10.1126/science.1249213>.
- Bradford MM. (1976)** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, **72**, 248-254.  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/942051>
- Brasseur G., Levican G., Bonnefoy V., Holmes D., Jedlicki E. & Lemesle-Meunier D. (2004)** Apparent redundancy of electron transfer pathways via bc(1) complexes and terminal oxidases in the extremophilic chemolithoautotrophic *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Biochim Biophys Acta*, **1656**: (2-3), 114-126.  
<https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2004.02.008>.
- Brito JA., Sousa FL., Stelter M., Bandejas TM., Vonnrhein C., Teixeira M., Pereira MM. & Archer M. (2009)** Structural and functional insights into sulfide:quinone oxidoreductase. *Biochemistry*, **48**: (24), 5613-5622.  
<https://doi.org/10.1021/bi9003827>.
- Brujininx PC., van Koten G. & Klein Gebbink RJ. (2008)** Mononuclear non-heme iron enzymes with the 2-His-1-carboxylate facial triad: recent developments in enzymology and modeling studies. *Chem Soc Rev*, **37**: (12), 2716-2744.  
<https://doi.org/10.1039/b707179p>.
- Brune DC (1995)** Sulfur compounds as photosynthetic electron donors. *Anoxygenic photosynthetic bacteria*, 847-870. Springer.  
[https://link.springer.com/chapter/10.1007/0-306-47954-0\\_39](https://link.springer.com/chapter/10.1007/0-306-47954-0_39)
- Brunold TC., Tamura N., Kitajima N., Moro-oka Y. & Solomon EI. (1998)** Spectroscopic Study of  $[\text{Fe}_2(\text{O}_2)(\text{OBz})_2\{\text{HB}(\text{pz})_3\}_2]$ : Nature of the  $\mu$ -1, 2 Peroxide–Fe(III) Bond and Its Possible Relevance to  $\text{O}_2$  Activation by Non-Heme Iron Enzymes. *J Am Chem Soc*, **120**: (23), 5674-5690.  
<https://doi.org/10.1021/ja980129x>.
- Brüser T., Selmer T. & Dahl C. (2000)** “ADP Sulfurylase” from *Thiobacillus denitrificans* Is an Adenylylsulfate: Phosphate Adenylyltransferase and Belongs to a New Family of Nucleotidyltransferases *J Biol Chem*, **275**: (3), 1691-1698.  
<https://doi.org/10.1074/jbc.275.3.1691>
- Budd MS. & Bewick HA. (1952)** Photometric Determination of Sulfide and Reducible Sulfur in Alkalies. *Anal Chem*, **24**: (10), 1536-1540.  
<https://doi.org/10.1021/ac60070a004>.
- Bugg TDH. (2001)** Oxygenases: mechanisms and structural motifs for  $\text{O}_2$  activation. *Curr Opin Chem Biol*, **5**: (5), 550-555.  
[https://doi.org/10.1016/s1367-5931\(00\)00236-2](https://doi.org/10.1016/s1367-5931(00)00236-2).
- Buongiorno D. & Straganz GD. (2013)** Structure and function of atypically coordinated enzymatic mononuclear non-heme-Fe(II) centers. *Coord Chem Rev*, **257**: (2), 541-563.  
<https://doi.org/10.1016/j.ccr.2012.04.028>.
- Bürgisser DM., Thöny B., Redweik U., Hess D., Heizmann CW., Huber R. & Nar H. (1995)** 6-Pyruvoyl tetrahydropterin synthase, an enzyme with a novel type of active site involving both zinc binding and an intersubunit catalytic triad motif; site-directed mutagenesis of the proposed active center, characterization of the metal binding site and modelling of substrate binding. *J Mol Biol*, **253**: (2), 358-369.  
<https://doi.org/10.1006/jmbi.1995.0558>.
- Cameron AD., Ridderström M., Olin B. & Mannervik B. (1999)** Crystal structure of human glyoxalase II and its complex with a glutathione thiolester substrate analogue. *Structure (London, England : 1993)*, **7**: (9), 1067-1078.  
[https://doi.org/10.1016/s0969-2126\(99\)80174-9](https://doi.org/10.1016/s0969-2126(99)80174-9).
- Catsimpoolas N. & Wood JL. (1964)** The Reaction of Cyanide with Bovine Serum Albumin. *J Biol Chem*, **239**: (12), 4131-4137.  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14247659>
- Chandra N., Acharya KR. & Moody PC. (1999)** Analysis and characterization of data from twinned crystals. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, **55**: (Pt 10), 1750-1758.  
<https://doi.org/10.1107/s0907444999009968>.
- Chanphai P., Bekale L. & Tajmir-Riahi HA. (2015)** Effect of hydrophobicity on protein–protein interactions. *Eur Polym*, **67**, 224-231.  
<https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2015.03.069>.

- Chen L., Ren Y., Lin J., Liu X., Pang X. & Lin J. (2012) *Acidithiobacillus caldus* sulfur oxidation model based on transcriptome analysis between the wild type and sulfur oxygenase reductase defective mutant. *PLoS One*, 7: (9), e39470. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0039470>.
- Chen S., McMullan G., Faruqi AR., Murshudov GN., Short JM., Scheres SH. & Henderson R. (2013) High-resolution noise substitution to measure overfitting and validate resolution in 3D structure determination by single particle electron cryomicroscopy. *Ultramicroscopy*, 135, 24-35. <https://doi.org/10.1016/j.ultramic.2013.06.004>.
- Chen VB., Arendall WB, 3rd., Headd JJ., Keedy DA., Immormino RM., Kapral GJ., Murray LW., Richardson JS. & Richardson DC. (2010) MolProbity: all-atom structure validation for macromolecular crystallography. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 66: (Pt 1), 12-21. <https://doi.org/10.1107/S0907444909042073>.
- Chen ZW., Jiang CY., She Q., Liu SJ. & Zhou PJ. (2005) Key role of cysteine residues in catalysis and subcellular localization of sulfur oxygenase-reductase of *Acidianus tengchongensis*. *Appl Environ Microbiol*, 71: (2), 621-628. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.2.621-628.2005>.
- Chivers PT. & Raines RT. (1997) General acid/base catalysis in the active site of *Escherichia coli* thioredoxin. *Biochemistry*, 36: (50), 15810-15816. <https://doi.org/10.1021/bi971504l>.
- Cho J., Jeon S., Wilson SA, *et al.* (2011) Structure and reactivity of a mononuclear non-haem iron(III)-peroxo complex. *Nature*, 478: (7370), 502-505. <https://doi.org/10.1038/nature10535>.
- Chomczynski P. & Sacchi N. (2006) The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction: twenty-something years on. *Nature Protoc*, 1: (2), 581-585. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.83>.
- Chovancova E., Pavelka A., Benes P, *et al.* (2012) CAVER 3.0: a tool for the analysis of transport pathways in dynamic protein structures. *PLoS Comput Biol*, 8: (10), e1002708. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1002708>.
- Christel S., Fridlund J., Buetti-Dinh A., Buck M., Watkin EL. & Dopson M. (2016) RNA transcript sequencing reveals inorganic sulfur compound oxidation pathways in the acidophile *Acidithiobacillus ferrivorans*. *FEMS Microbiol Lett*, 363: (7), <https://doi.org/10.1093/femsle/fnw057>.
- Citri N. & Zyk N. (1965) The interaction of penicillinase with penicillins. IV. Structural aspects of catalytic and non-catalytic interactions. *Biochim Biophys Acta*, 99: (3), 427-441. [https://doi.org/10.1016/s0926-6593\(65\)80197-7](https://doi.org/10.1016/s0926-6593(65)80197-7).
- Clarke PH. (1953) Hydrogen sulphide production by bacteria. *J Gen Microbiol*, 8: (3), 397-407. <https://doi.org/10.1099/00221287-8-3-397>.
- Coggins MK., Sun X., Kwak Y., Solomon EI., Rybak-Akimova E. & Kovacs JA. (2013) Characterization of metastable intermediates formed in the reaction between a Mn (II) complex and dioxygen, including a crystallographic structure of a binuclear Mn (III)-peroxo species. *J Am Chem Soc*, 135: (15), 5631-5640. <https://doi.org/10.1021/ja311166u>.
- Costas M., Mehn MP., Jensen MP. & Que L, Jr. (2004) Dioxygen activation at mononuclear nonheme iron active sites: enzymes, models, and intermediates. *Chem Rev*, 104: (2), 939-986. <https://doi.org/10.1021/cr020628n>.
- Crowder MW., Maiti MK., Banovic L. & Makaroff CA. (1997) Glyoxalase II from *A. thaliana* requires Zn(II) for catalytic activity. *FEBS Lett*, 418: (3), 351-354. [https://doi.org/10.1016/s0014-5793\(97\)01416-6](https://doi.org/10.1016/s0014-5793(97)01416-6).
- Dahl C. (1996) Insertional gene inactivation in a phototrophic sulphur bacterium: APS-reductase-deficient mutants of *Chromatium vinosum*. *Microbiol-Sgm*, 142 ( Pt 12): (12), 3363-3372. <https://doi.org/10.1099/13500872-142-12-3363>.
- Dahl C., Engels S., Pott-Sperling AS., Schulte A., Sander J., Lubbe Y., Deuster O. & Brune DC. (2005) Novel genes of the dsr gene cluster and evidence for close interaction of Dsr proteins during sulfur oxidation in the phototrophic sulfur bacterium *Allochromatium vinosum*. *J Bacteriol*, 187: (4), 1392-1404. <https://doi.org/10.1128/JB.187.4.1392-1404.2005>.
- Dahl C., Friedrich C. & Kletzin A (2008a) Sulfur Oxidation in Prokaryotes. *Encyclopedia of Life Sciences*.
- Dahl C., Schulte A., Stockdreher Y., Hong C., Grimm F., Sander J., Kim R., Kim SH. & Shin DH. (2008b) Structural and molecular genetic insight into a widespread sulfur oxidation pathway. *J Mol Biol*, 384: (5), 1287-1300. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2008.10.016>.
- Dahl C., Franz B., Hensen D., Kesselheim A. & Zigann R. (2013) Sulfite oxidation in the purple sulfur bacterium *Allochromatium vinosum*: identification of SoeABC as a major player and relevance of SoxYZ in the process. *Microbiol-Sgm*, 159: (Pt 12), 2626-2638. <https://doi.org/10.1099/mic.0.071019-0>.
- Dahl C. (2015) Cytoplasmic sulfur trafficking in sulfur-oxidizing prokaryotes. *Iubmb Life*, 67: (4), 268-274. <https://doi.org/10.1002/iub.1371>.
- Dahl C (2017) Sulfur Metabolism in Phototrophic Bacteria. *Modern Topics in the Phototrophic Prokaryotes*, 27-66. Springer. <https://pdfs.semanticscholar.org/92a6/42f9d83fbd5ff4cc1e4f77c77793d38569ef.pdf>
- Dalle-Donne I., Rossi R., Colombo G., Giustarini D. & Milzani A. (2009) Protein S-glutathionylation: a regulatory device from bacteria to humans. *Trends Biochem Sci*, 34: (2), 85-96. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2008.11.002>.

- Dauter Z. (2003) Twinned crystals and anomalous phasing. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, **59**: (Pt 11), 2004-2016. <https://doi.org/10.1107/s0907444903021085>.
- Dekker L., Arsene-Ploetze F. & Santini JM. (2016) Comparative proteomics of *Acidithiobacillus ferrooxidans* grown in the presence and absence of uranium. *Res Microbiol*, **167**: (3), 234-239. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2016.01.007>.
- Di Meo I., Lamperti C. & Tiranti V. (2015) Mitochondrial diseases caused by toxic compound accumulation: from etiopathology to therapeutic approaches. *EMBO Mol Med*, **7**: (10), 1257-1266. <https://doi.org/10.15252/emmm.201505040>.
- Dooley CT., Dore TM., Hanson GT., Jackson WC., Remington SJ. & Tsien RY. (2004) Imaging dynamic redox changes in mammalian cells with green fluorescent protein indicators. *J Biol Chem*, **279**: (21), 22284-22293. <https://doi.org/10.1074/jbc.M312847200>.
- Dopson M. & Johnson DB. (2012) Biodiversity, metabolism and applications of acidophilic sulfur-metabolizing microorganisms. *Environ Microbiol*, **14**: (10), 2620-2631. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2012.02749.x>.
- Edwards KJ., Bond PL. & Banfield JF. (2000) Characteristics of attachment and growth of *Thiobacillus caldus* on sulphide minerals: a chemotactic response to sulphur minerals? *Environ Microbiol*, **2**: (3), 324-332. <https://doi.org/10.1046/j.1462-2920.2000.00111.x>.
- Eisenberg D., Schwarz E., Komaromy M. & Wall R. (1984) Analysis of membrane and surface protein sequences with the hydrophobic moment plot. *J Mol Biol*, **179**: (1), 125-142. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(84\)90309-7](https://doi.org/10.1016/0022-2836(84)90309-7).
- Emmel T., Sand W., König WA. & Bock E. (1986) Evidence for the Existence of a Sulfur Oxygenase in *Sulfolobus Brierleyi*. *J Gen Microbiol*, **132**: (12), 3415-3420. <https://doi.org/doi:10.1099/00221287-132-12-3415>.
- Emsley P. & Cowtan K. (2004) Coot: model-building tools for molecular graphics. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, **60**: (12 Pt 1), 2126-2132. <https://doi.org/10.1107/S0907444904019158>.
- Emsley P., Lohkamp B., Scott WG. & Cowtan K. (2010) Features and development of Coot. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, **66**: (Pt 4), 486-501. <https://doi.org/10.1107/S0907444910007493>.
- Essmann U., Perera L., Berkowitz ML., Darden T., Lee H. & Pedersen LG. (1995) A Smooth Particle Mesh Ewald Method. *J Chem Phys*, **103**: (19), 8577-8593. <https://doi.org/10.1063/1.470117>.
- Falkowski PG., Fenchel T. & Delong EF. (2008) The microbial engines that drive Earth's biogeochemical cycles. *Science*, **320**: (5879), 1034-1039. <https://doi.org/10.1126/science.1153213>.
- Fan W., Peng Y., Meng Y., Zhang W., Zhu N., Wang J., Guo C., Li J., Du H. & Dang Z. (2018) Transcriptomic Analysis Reveals Reduced Inorganic Sulfur Compound Oxidation Mechanism in *Acidithiobacillus ferrophilus*. *Microbiol-Sgm*, **87**: (4), 486-501. <https://doi.org/10.1134/s0026261718040070>.
- Findlay AJ. & Kamysnyy A. (2017) Turnover Rates of Intermediate Sulfur Species ( $S^{2-}$ ,  $S^0$ ,  $S_2O_3^{2-}$ ,  $S_4O_6^{2-}$ ,  $SO_3^{2-}$ ) in Anoxic Freshwater and Sediments. *Front Microbiol*, **8**, 2551. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02551>.
- Fischer AA., Lindeman SV. & Fiedler AT. (2018) A synthetic model of the nonheme iron-superoxo intermediate of cysteine dioxygenase. *Chem Commun (Camb)*, **54**: (80), 11344-11347. <https://doi.org/10.1039/c8cc06247a>.
- Fischer DS. & Price DC. (1964) A Simple Serum Iron Method Using the New Sensitive Chromogen Tripyridyl-S-Triazine. *Clin Chem*, **10**, 21-31. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14110802>
- Flohé L. (2013) The fairytale of the GSSG/GSH redox potential. *Biochim Biophys Acta*, **1830**: (5), 3139-3142. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2012.10.020>.
- Francis RT, Jr. & Becker RR. (1984) Specific indication of hemoproteins in polyacrylamide gels using a double-staining process. *Anal Biochem*, **136**: (2), 509-514. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(84\)90253-7](https://doi.org/10.1016/0003-2697(84)90253-7).
- Franz B., Lichtenberg H., Hormes J., Modrow H., Dahl C. & Prange A. (2007) Utilization of solid "elemental" sulfur by the phototrophic purple sulfur bacterium *Allochromatium vinosum*: a sulfur K-edge X-ray absorption spectroscopy study. *Microbiol-Sgm*, **153**: (Pt 4), 1268-1274. <https://doi.org/10.1099/mic.0.2006/003954-0>.
- Friedrich CG., Quentmeier A., Bardischewsky F., Rother D., Kraft R., Kostka S. & Prinz H. (2000) Novel genes coding for lithotrophic sulfur oxidation of *Paracoccus pantotrophus* GB17. *J Bacteriol*, **182**: (17), 4677-4687. <https://doi.org/10.1128/jb.182.17.4677-4687.2000>.
- Friedrich CG., Bardischewsky F., Rother D., Quentmeier A. & Fischer J. (2005) Prokaryotic sulfur oxidation. *Curr Opin Microbiol*, **8**: (3), 253-259. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2005.04.005>.
- Friedrich CG., Quentmeier A., Bardischewsky F., Rother D., Orawski G., Hellwig P. & Fischer J (2008) Redox control of chemotrophic sulfur oxidation of *Paracoccus pantotrophus*. *Microbial Sulfur Metabolism*, 139-150. Springer. [https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-540-72682-1\\_12](https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-540-72682-1_12)

- Friesner RA., Banks JL., Murphy RB, *et al.* (2004) Glide: a new approach for rapid, accurate docking and scoring. 1. Method and assessment of docking accuracy. *J Med Chem*, **47**: (7), 1739-1749. <https://doi.org/10.1021/jm0306430>.
- Frigaard NU. & Dahl C. (2009) Sulfur metabolism in phototrophic sulfur bacteria. *Adv Microb Physiol*, **54**, 103-200. [https://doi.org/10.1016/S0065-2911\(08\)00002-7](https://doi.org/10.1016/S0065-2911(08)00002-7).
- Fritz G., Büchert T., Huber H., Stetter KO. & Kroneck PMH. (2000) Adenylylsulfate reductases from archaea and bacteria are 1:1  $\alpha\beta$ -heterodimeric iron-sulfur flavoenzymes - high similarity of molecular properties emphasizes their central role in sulfur metabolism. *FEBS Letters*, **473**: (1), 63-66. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(00\)01500-3](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(00)01500-3).
- Frömmel C. & Höhne WE. (1981) Influence of calcium binding on the thermal stability of 'thermitase', a serine protease from *Thermoactinomyces vulgaris*. *Biochim Biophys Acta*, **670**: (1), 25-31. [https://doi.org/10.1016/0005-2795\(81\)90044-1](https://doi.org/10.1016/0005-2795(81)90044-1)
- Fuchs T., Huber H., Burggraf S. & Stetter KO. (1996) 16S rDNA-based phylogeny of the archaeal order *Sulfolobales* and reclassification of *Desulfurolobus ambivalens* as *Acidianus ambivalens* comb. nov. *Syst Appl Microbiol*, **19**: (1), 56-60. [https://doi.org/10.1016/S0723-2020\(96\)80009-9](https://doi.org/10.1016/S0723-2020(96)80009-9).
- Garcia-Pino A., Martinez-Rodriguez S., Wahni K., Wyns L., Loris R. & Messens J. (2009) Coupling of domain swapping to kinetic stability in a thioredoxin mutant. *J Mol Biol*, **385**: (5), 1590-1599. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2008.11.040>.
- Ghosh W. & Dam B. (2009) Biochemistry and molecular biology of lithotrophic sulfur oxidation by taxonomically and ecologically diverse bacteria and archaea. *FEMS Microbiol Rev*, **33**: (6), 999-1043. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2009.00187.x>.
- Giggenbach W. (1972) Optical spectra and equilibrium distribution of polysulfide ions in aqueous solution at 20.deg. *Inorg Chem*, **11**: (6), 1201-1207. <https://doi.org/10.1021/ic50112a009>.
- Gigliione C., Boularot A. & Meinnel T. (2004) Protein N-terminal methionine excision. *Cell Mol Life Sci*, **61**: (12), 1455-1474. <https://doi.org/10.1007/s00018-004-3466-8>.
- Gillet LC., Navarro P., Tate S., Röst H., Selevsek N., Reiter L., Bonner R. & Aebersold R. (2012) Targeted data extraction of the MS/MS spectra generated by data-independent acquisition: a new concept for consistent and accurate proteome analysis. *Mol Cell Proteomics*, **11**: (6), O111 016717. <https://doi.org/10.1074/mcp.O111.016717>.
- Goddard TD., Huang CC., Meng EC., Pettersen EF., Couch GS., Morris JH. & Ferrin TE. (2018) UCSF ChimeraX: Meeting modern challenges in visualization and analysis. *Protein Sci*, **27**: (1), 14-25. <https://doi.org/10.1002/pro.3235>.
- Goebel BM. & Stackebrandt E. (1994) Cultural and phylogenetic analysis of mixed microbial populations found in natural and commercial bioleaching environments. *Appl Environ Microbiol*, **60**: (5), 1614-1621. <https://aem.asm.org/content/60/5/1614.long>
- Goldstein F. (1950) The colorimetric determination of thiocyanate in whole blood. *J Biol Chem*, **187**: (2), 523-527. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14803433>
- Gorbikova EA., Belevich I., Wikström M. & Verkhovsky MI. (2008) The proton donor for O-O bond scission by cytochrome c oxidase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **105**: (31), 10733-10737. <https://doi.org/10.1073/pnas.0802512105>.
- Gorin G., Esfandi A. & Guthrie Jr. GB. (1975) Glutathione - Its Reaction with Nadp and Its Oxidation-Reduction Potential. *Arch Biochem Biophys*, **168**: (2), 450-454. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(75\)90274-X](https://doi.org/10.1016/0003-9861(75)90274-X).
- Goudarzi S., Babicz JT, Jr., Kabil O., Banerjee R. & Solomon EI. (2018) Spectroscopic and Electronic Structure Study of ETHE1: Elucidating the Factors Influencing Sulfur Oxidation and Oxygenation in Mononuclear Nonheme Iron Enzymes. *J Am Chem Soc*, **140**: (44), 14887-14902. <https://doi.org/10.1021/jacs.8b09022>.
- Grabarczyk DB. & Berks BC. (2017) Intermediates in the Sox sulfur oxidation pathway are bound to a sulfane conjugate of the carrier protein SoxYZ. *PLoS One*, **12**: (3), e0173395. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0173395>.
- Grant S., Grant WD., Jones BE., Kato C. & Li L. (1999) Novel archaeal phylotypes from an East African alkaline saltern. *Extremophiles*, **3**: (2), 139-145. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10357000>
- Gray HB. & Winkler JR. (2009) Electron flow through proteins. *Chem Phys Let*, **483**: (1), 1-9. <https://doi.org/10.1016/j.cplett.2009.10.051>.
- Gregersen LH., Bryant DA. & Frigaard NU. (2011) Mechanisms and evolution of oxidative sulfur metabolism in green sulfur bacteria. *Front Microbiol*, **2**, 116. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2011.00116>.
- Grek CL., Zhang J., Manevich Y., Townsend DM. & Tew KD. (2013) Causes and consequences of cysteine S-glutathionylation. *J Biol Chem*, **288**: (37), 26497-26504. <https://doi.org/10.1074/jbc.R113.461368>
- Grießler R., D'Auria S., Tanfani F. & Nidetzky B. (2000) Thermal denaturation pathway of starch phosphorylase from *Corynebacterium callunae*: Oxyanion binding provides the glue that efficiently stabilizes the dimer structure of the protein. *Protein Sci*, **9**: (6), 1149-1161. <https://doi.org/10.1110/ps.9.6.1149>.

- Guo X., Yin H., Liang Y., Hu Q., Zhou X., Xiao Y., Ma L., Zhang X., Qiu G. & Liu X. (2014) Comparative genome analysis reveals metabolic versatility and environmental adaptations of *Sulfobacillus thermosulfidooxidans* strain ST. *PLoS One*, **9**: (6), e99417. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0099417>.
- Hagen KD. & Nelson DC. (1997) Use of reduced sulfur compounds by *Beggiatoa* spp.: Enzymology and physiology of marine and freshwater strains in homogeneous and gradient cultures. *Appl Environ Microbiol*, **63**: (10), 3957-3964. <https://aem.asm.org/content/63/10/3957.long>
- Hahn T., Shmueli U. & Arthur JW (1983) *International tables for crystallography*. Reidel Dordrecht.
- Hallberg KB. & Lindström EB. (1994) Characterization of *Thiobacillus caldus* sp. nov., a moderately thermophilic acidophile. *Microbiol-Sgm*, **140** 3451-3456. <https://doi.org/10.1099/13500872-140-12-3451>.
- Hallberg KB., Dopson M. & Lindström EB. (1996) Reduced sulfur compound oxidation by *Thiobacillus caldus*. *J Bacteriol*, **178**: (1), 6-11. <https://doi.org/10.1128/jb.178.1.6-11.1996>.
- Hamilton EM. (1991) The Chemistry of Low Valent Sulfur Compounds in the S-HO System. *Dissertation*, University of Minnesota.
- Hazeu W., Batenburg-Van der Vegte W., Bos P., Van der Pas R. & Kuenen J. (1988) The production and utilization of intermediary elemental sulfur during the oxidation of reduced sulfur compounds by *Thiobacillus ferrooxidans*. *Arch Microbiol*, **150**: (6), 574-579. <https://doi.org/10.1007/BF00408252>.
- He H., Xia J-L., Jiang H-C., Yan Y., Liang C-L., Ma C-Y., Zheng L., Zhao Y-D. & Qiu G-Z. (2010) Sulfur species investigation in extra-and intracellular sulfur globules of *Acidithiobacillus ferrooxidans* and *Acidithiobacillus caldus*. *Geomicrobiol J*, **27**: (8), 707-713. <https://doi.org/10.1080/01490451003597655>.
- He Z., Li Y., Zhou P. & Liu S. (2000) Cloning and heterologous expression of a sulfur oxygenase/reductase gene from the thermoacidophilic archaeon *Acidianus* sp. S5 in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Lett*, **193**: (2), 217-221. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2000.tb09427.x>.
- Hedderich R., Hamann N. & Bennati M. (2005) Heterodisulfide reductase from methanogenic archaea: a new catalytic role for an iron-sulfur cluster. *Biol Chem*, **386**: (10), 961. <https://doi.org/10.1515/BC.2005.112>.
- Hegg EL. & Que L, Jr. (1997) The 2-His-1-carboxylate facial triad - an emerging structural motif in mononuclear non-heme iron(II) enzymes. *Eur J Biochem*, **250**: (3), 625-629. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1997.t01-1-00625.x>.
- Hempfling WP. & Vishniac W. (1967) Yield coefficients of *Thiobacillus neapolitanus* in continuous culture. *J Bacteriol*, **93**: (3), 874-878. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6025430>
- Hemsley A., Arnheim N., Toney MD., Cortopassi G. & Galas DJ. (1989) A simple method for site-directed mutagenesis using the polymerase chain reaction. *Nucleic Acids Res*, **17**: (16), 6545-6551. <https://doi.org/10.1093/nar/17.16.6545>
- Henriques BJ., Lucas TG., Rodrigues JV., Frederiksen JH., Teixeira MS., Tiranti V., Bross P. & Gomes CM. (2014) Ethylmalonic encephalopathy ETHE1 R163W/R163Q mutations alter protein stability and redox properties of the iron centre. *PLoS One*, **9**: (9), e107157. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0107157>.
- Hensen D., Sperling D., Trüper HG., Brune DC. & Dahl C. (2006) Thiosulphate oxidation in the phototrophic sulphur bacterium *Allochrochromatium vinosum*. *Mol Microbiol*, **62**: (3), 794-810. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2006.05408.x>.
- Hildebrandt TM. & Grieshaber MK. (2008) Three enzymatic activities catalyze the oxidation of sulfide to thiosulfate in mammalian and invertebrate mitochondria. *FEBS J*, **275**: (13), 3352-3361. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2008.06482.x>.
- Holkenbrink C., Barbas SO., Møllerup A., Otaki H. & Frigaard NU. (2011) Sulfur globule oxidation in green sulfur bacteria is dependent on the dissimilatory sulfite reductase system. *Microbiol-Sgm*, **157**: (Pt 4), 1229-1239. <https://doi.org/10.1099/mic.0.044669-0>.
- Hou T., Wang J., Li Y. & Wang W. (2011) Assessing the performance of the MM/PBSA and MM/GBSA methods. 1. The accuracy of binding free energy calculations based on molecular dynamics simulations. *J Chem Inf Model*, **51**: (1), 69-82. <https://doi.org/10.1021/ci100275a>.
- Huang da W., Sherman BT. & Lempicki RA. (2009a) Bioinformatics enrichment tools: paths toward the comprehensive functional analysis of large gene lists. *Nucleic Acids Res*, **37**: (1), 1-13. <https://doi.org/10.1093/nar/gkn923>.
- Huang da W., Sherman BT. & Lempicki RA. (2009b) Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nat Protoc*, **4**: (1), 44-57. <https://doi.org/10.1038/nprot.2008.211>.
- Iciek M. & Wlodek L. (2001) Biosynthesis and biological properties of compounds containing highly reactive, reduced sulfane sulfur. *Pol J Pharmacol*, **53**: (3), 215-225. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11785922>

- Imhoff JF., Süling J. & Petri R. (1998) Phylogenetic relationships among the *Chromatiaceae*, their taxonomic reclassification and description of the new genera *Allochromatium*, *Halochromatium*, *Isochromatium*, *Marichromatium*, *Thiococcus*, *Thiohalocapsa* and *Thermochromatium*. *Int J Syst Bacteriol*, **48** Pt 4: (4), 1129-1143. <https://doi.org/10.1099/00207713-48-4-1129>.
- Jackson MR., Melideo SL. & Jorns MS. (2012) Human sulfide:quinone oxidoreductase catalyzes the first step in hydrogen sulfide metabolism and produces a sulfane sulfur metabolite. *Biochemistry*, **51**: (34), 6804-6815. <https://doi.org/10.1021/bi300778t>.
- Jannasch HW. & Mottl MJ. (1985) Geomicrobiology of deep-sea hydrothermal vents. *Science*, **229**: (4715), 717-725. <https://doi.org/10.1126/science.229.4715.717>.
- Janosch C., Thyssen C., Vera MA., Bonnefoy V., Rohwerder T. & Sand W. (2009) Sulfur oxygenase reductase in different *Acidithiobacillus caldus*-like strains. *Adv Mat Res*, **71**, 239-242. <http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.929.1499&rep=rep1&type=pdf>
- Janosch C., Remonsellez F., Sand W. & Vera M. (2015) Sulfur Oxygenase Reductase (Sor) in the Moderately Thermoacidophilic Leaching Bacteria: Studies in *Sulfobacillus thermosulfidooxidans* and *Acidithiobacillus caldus*. *Microorganisms*, **3**: (4), 707-724. <https://doi.org/10.3390/microorganisms3040707>.
- Jones S. & Thornton JM. (1996) Principles of protein-protein interactions. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**: (1), 13-20. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.1.13>.
- Jung M., Kasamatsu S., Matsunaga T, *et al.* (2016) Protein polysulfidation-dependent persulfide dioxygenase activity of ethylmalonic encephalopathy protein 1. *Biochem Biophys Res Commun*, **480**: (2), 180-186. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2016.10.022>.
- Kabil O. & Banerjee R. (2012) Characterization of patient mutations in human persulfide dioxygenase (ETHE1) involved in H<sub>2</sub>S catabolism. *J Biol Chem*, **287**: (53), 44561-44567. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.407411>.
- Kabil O. & Banerjee R. (2014) Enzymology of H<sub>2</sub>S biogenesis, decay and signaling. *Antioxid Redox Signal*, **20**: (5), 770-782. <https://doi.org/10.1089/ars.2013.5339>.
- Kabil O., Motl N., Strack M., Seravalli J., Metzler-Nolte N. & Banerjee R. (2018) Mechanism-based inhibition of human persulfide dioxygenase by gamma-glutamyl-homocysteinyl-glycine. *J Biol Chem*, **293**: (32), 12429-12439. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA118.004096>.
- Kabsch W. (2010) Xds. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, **66**: (Pt 2), 125-132. <https://doi.org/10.1107/S0907444909047337>.
- Kal S. & Que L. (2017) Dioxygen activation by nonheme iron enzymes with the 2-His-1-carboxylate facial triad that generate high-valent oxoiron oxidants. *J Biol Inorg Chem*, **22**: (2-3), 339-365. <https://doi.org/10.1007/s00775-016-1431-2>.
- Kamimura K., Okayama T., Murakami K. & Sugio T. (1999) Isolation and characterization of a moderately thermophilic sulphur-oxidizing bacterium. *Microbios*, **99**: (392), 7-18. <https://okayama.pure.elsevier.com/en/publications/isolation-and-characterization-of-a-moderately-thermophilic-sulph>
- Kamysny A. (2009) Solubility of cyclooctasulfur in pure water and sea water at different temperatures. *Geochimica Et Cosmochimica Acta*, **73**: (20), 6022-6028. <https://doi.org/10.1016/j.gca.2009.07.003>.
- Kanehisa M. & Goto S. (2000) KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes. *Nucleic Acids Res*, **28**: (1), 27-30. <https://doi.org/10.1093/nar/28.1.27>.
- Kanehisa M., Sato Y., Furumichi M., Morishima K. & Tanabe M. (2019) New approach for understanding genome variations in KEGG. *Nucleic Acids Res*, **47**: (D1), D590-D595. <https://doi.org/10.1093/nar/gky962>.
- Karaman R. & Menger FM. (2012) Proton shuffling in acid/base-catalyzed enolizations: a computational study. *J Phys Org*, **25**: (12), 1336-1342. <https://doi.org/10.1002/poc.3031>.
- Kaster AK., Moll J., Parey K. & Thauer RK. (2011) Coupling of ferredoxin and heterodisulfide reduction via electron bifurcation in hydrogenotrophic methanogenic archaea. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **108**: (7), 2981-2986. <https://doi.org/10.1073/pnas.1016761108>.
- Keller A., Nesvizhskii AI., Kolker E. & Aebersold R. (2002) Empirical statistical model to estimate the accuracy of peptide identifications made by MS/MS and database search. *Anal Chem*, **74**: (20), 5383-5392. <https://doi.org/10.1021/ac025747h>.
- Kelley LA., Mezulis S., Yates CM., Wass MN. & Sternberg MJ. (2015) The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis. *Nat Protoc*, **10**: (6), 845-858. <https://doi.org/10.1038/nprot.2015.053>.
- Kelly DP. (1979) The sulphur cycle: definitions, mechanisms and dynamics. *Ciba Found Symp*, (72), 3-18. <https://doi.org/10.1002/9780470720554.ch2>.
- Kim C., Chen K., Kim J. & Que L. (1997) Stereospecific alkane hydroxylation with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> catalyzed by an iron (II)-tris(2-pyridylmethyl)amine complex. *J Am Chem Soc*, **119**: (25), 5964-5965. <https://doi.org/10.1021/ja9642572>.



- King TE. & Morris RO. (1967) [98] Determination of acid-labile sulfide and sulfhydryl groups. *Method Enzymol*, **10**, 634-641. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(67\)10105-5](https://doi.org/10.1016/0076-6879(67)10105-5).
- Kletzin A. (1989) Coupled enzymatic production of sulfite, thiosulfate, and hydrogen sulfide from sulfur: purification and properties of a sulfur oxygenase reductase from the facultatively anaerobic archaebacterium *Desulfurolobus ambivalens*. *J Bacteriol*, **171**: (3), 1638-1643. <https://doi.org/10.1128/jb.171.3.1638-1643.1989>
- Kletzin A. (1992) Molecular characterization of the *sor* gene, which encodes the sulfur oxygenase/reductase of the thermoacidophilic Archaeum *Desulfurolobus ambivalens*. *J Bacteriol*, **174**: (18), 5854-5859. <https://doi.org/10.1128/jb.174.18.5854-5859.1992>
- Kletzin A., Urich T., Müller F., Bandejas TM. & Gomes CM. (2004) Dissimilatory oxidation and reduction of elemental sulfur in thermophilic archaea. *J Bioenerg Biomembr*, **36**: (1), 77-91. <https://doi.org/10.1023/B:JOBB.0000019600.36757.8c>.
- Kletzin A (2006) Metabolism of Inorganic Sulfur Compounds in Archaea. *Archaea*, 261-274. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/9780470750865.ch23>
- Kletzin A (2008) Oxidation of Sulfur and Inorganic Sulfur Compounds in *Acidianus ambivalens*. *Microbial sulfur metabolism*, 184-201. Springer, Berlin, Heidelberg. [https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-540-72682-1\\_15](https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-540-72682-1_15)
- Klimmek O., Kröger A., Steudel R. & Holdt G. (1991) Growth of *Wolinella succinogenes* with polysulphide as terminal acceptor of phosphorylative electron transport. *Arch Microbiol*, **155**: (2), 177-182. <https://doi.org/10.1007/BF00248614>.
- Koch T. & Dahl C. (2018) A novel bacterial sulfur oxidation pathway provides a new link between the cycles of organic and inorganic sulfur compounds. *ISME J*, **12**: (10), 2479-2491. <https://doi.org/10.1038/s41396-018-0209-7>.
- Koehntop KD., Emerson JP. & Que L, Jr. (2005) The 2-His-1-carboxylate facial triad: a versatile platform for dioxygen activation by mononuclear non-heme iron(II) enzymes. *J Biol Inorg Chem*, **10**: (2), 87-93. <https://doi.org/10.1007/s00775-005-0624-x>.
- Kostanjevecki V., Brigé A., Meyer TE., Cusanovich MA., Guisez Y. & Van Beeumen J. (2000) A Membrane-Bound Flavocytochrome c-Sulfide Dehydrogenase from the Purple Phototrophic Sulfur Bacterium *Ectothiorhodospira vacuolata*. *J Bacteriol*, **182**: (11), 3097-3103. <https://doi.org/10.1128/JB.182.11.3097-3103.2000>.
- Krieger E., Nielsen JE., Spronk CA. & Vriend G. (2006) Fast empirical pKa prediction by Ewald summation. *J Mol Graph Model*, **25**: (4), 481-486. <https://doi.org/10.1016/j.jmgm.2006.02.009>.
- Krieger E., Joo K., Lee J., Lee J., Raman S., Thompson J., Tyka M., Baker D. & Karplus K. (2009) Improving physical realism, stereochemistry, and side-chain accuracy in homology modeling: Four approaches that performed well in CASP8. *Proteins*, **77** (9), 114-122. <https://doi.org/10.1002/prot.22570>.
- Krieger E., Dunbrack RL, Jr., Hooft RW. & Krieger B. (2012) Assignment of protonation states in proteins and ligands: combining pKa prediction with hydrogen bonding network optimization. *Methods Mol Biol*, **819**, 405-421. [https://doi.org/10.1007/978-1-61779-465-0\\_25](https://doi.org/10.1007/978-1-61779-465-0_25).
- Krieger E. & Vriend G. (2014) YASARA View - molecular graphics for all devices - from smartphones to workstations. *Bioinformatics*, **30**: (20), 2981-2982. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu426>.
- Krieger E. & Vriend G. (2015) New ways to boost molecular dynamics simulations. *J Comput Chem*, **36**: (13), 996-1007. <https://doi.org/10.1002/jcc.23899>.
- Krogh A., Larsson B., von Heijne G. & Sonnhammer EL. (2001) Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes. *J Mol Biol*, **305**: (3), 567-580. <https://doi.org/10.1006/jmbi.2000.4315>.
- Kucukelbir A., Sigworth FJ. & Tagare HD. (2014) Quantifying the local resolution of cryo-EM density maps. *Nature methods*, **11**: (1), 63-65. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2727>.
- Kumar D., Hirao H., Shaik S. & Kozlowski PM. (2006) Proton-shuffle mechanism of O-O activation for formation of a high-valent oxo-iron species of bleomycin. *J Am Chem Soc*, **128**: (50), 16148-16158. <https://doi.org/10.1021/ja064611o>.
- Lamprea J., Pereira AS. & Moura JG (1994) [16] Adenylylsulfate reductases from sulfate-reducing bacteria. *Methods Enzymol*, **243**, 241-260. Elsevier. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0076687994430187>
- Landry AP., Ballou DP. & Banerjee R. (2017) H<sub>2</sub>S oxidation by nanodisc-embedded human sulfide quinone oxidoreductase. *J Biol Chem*, **292**: (28), 11641-11649. <https://doi.org/10.1074/jbc.M117.788547>.
- Lens PN. & Kuenen JG. (2001) The biological sulfur cycle: novel opportunities for environmental biotechnology. *Water Sci Technol*, **44**: (8), 57-66. <https://doi.org/10.2166/wst.2001.0464>.
- Levitt M. & Chothia C. (1976) Structural patterns in globular proteins. *Nature*, **261**: (5561), 552-558. <https://doi.org/10.1038/261552a0>.

- Li M., Chen Z., Zhang P., Pan X., Jiang C., An X., Liu S. & Chang W. (2008) Crystal structure studies on sulfur oxygenase reductase from *Acidianus tengchongensis*. *Biochem Biophys Res Commun*, **369**: (3), 919-923.  
<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2008.02.131>.
- Lin BB., Ma GC. & Liu YJ. (2016) Mechanism of the Glutathione Persulfide Oxidation Process Catalyzed by Ethylmalonic Encephalopathy Protein 1. *ACS Catal*, **6**: (10), 7010-7020.  
<https://doi.org/10.1021/acscatal.6b01417>.
- Liu H., Xin Y. & Xun L. (2014) Distribution, diversity, and activities of sulfur dioxygenases in heterotrophic bacteria. *Appl Environ Microbiol*, **80**: (5), 1799-1806.  
<https://doi.org/10.1128/AEM.03281-13>.
- Losensky G., Jung K., Urlaub H., Pfeifer F., Fröls S. & Lenz C. (2017) Shedding light on biofilm formation of *Halobacterium salinarum* R1 by SWATH-LC/MS/MS analysis of planktonic and sessile cells. *Proteomics*, **17**: (7),  
<https://doi.org/10.1002/pmic.201600111>.
- Love MI., Huber W. & Anders S. (2014) Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol*, **15**: (12), 550.  
<https://doi.org/10.1186/s13059-014-0550-8>.
- Lu J. & Deutsch C. (2001) Pegylation: A Method for Assessing Topological Accessibilities in Kv1.3. *Biochemistry*, **40**: (44), 13288-13301.  
<https://doi.org/10.1021/bi0107647>.
- Lübben M., Arnaud S., Castresana J., Warne A., Albracht SP. & Saraste M. (1994a) A second terminal oxidase in *Sulfolobus acidocaldarius*. *Eur J Biochem*, **224**: (1), 151-159.  
<https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1994.tb20006.x>.
- Lübben M., Warne A., Albracht SP. & Saraste M. (1994b) The purified SoxABCD quinol oxidase complex of *Sulfolobus acidocaldarius* contains a novel haem. *Mol Microbiol*, **13**: (2), 327-335.  
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1994.tb00426.x>.
- Luo W. & Brouwer C. (2013) Pathview: an R/Bioconductor package for pathway-based data integration and visualization. *Bioinformatics*, **29**: (14), 1830-1831.  
<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btt285>.
- Maiti MK., Krishnasamy S., Owen HA. & Makaroff CA. (1997) Molecular characterization of glyoxalase II from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol Biol*, **35**: (4), 471-481.  
<https://doi.org/10.1023/a:1005891123344>.
- Manevich Y., Reddy KS., Shuvaeva T., Feinstein SI. & Fisher AB. (2007) Structure and phospholipase function of peroxiredoxin 6: identification of the catalytic triad and its role in phospholipid substrate binding. *J Lipid Res*, **48**: (10), 2306-2318.  
<https://doi.org/10.1194/jlr.M700299-JLR200>.
- Mangold S., Valdes J., Holmes DS. & Dopson M. (2011) Sulfur metabolism in the extreme acidophile *Acidithiobacillus caldus*. *Front Microbiol*, **2**, 17. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2011.00017>.
- Marasinghe GP., Sander IM., Bennett B., Periyannan G., Yang KW., Makaroff CA. & Crowder MW. (2005) Structural studies on a mitochondrial glyoxalase II. *J Biol Chem*, **280**: (49), 40668-40675.  
<https://doi.org/10.1074/jbc.M509748200>.
- Marcia M., Ermiler U., Peng G. & Michel H. (2009) The structure of *Aquifex aeolicus* sulfide:quinone oxidoreductase, a basis to understand sulfide detoxification and respiration. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **106**: (24), 9625-9630.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.0904165106>.
- Marnocha CL., Levy AT., Powell DH., Hanson TE. & Chan CS. (2016) Mechanisms of extracellular S<sup>0</sup> globule production and degradation in *Chlorobaculum tepidum* via dynamic cell-globule interactions. *Microbiol-Sgm*, **162**: (7), 1125-1134.  
<https://doi.org/10.1099/mic.0.000294>.
- McCoy AJ., Grosse-Kunstleve RW., Adams PD., Winn MD., Storoni LC. & Read RJ. (2007) Phaser crystallographic software. *J Appl Crystallogr*, **40**: (Pt 4), 658-674.  
<https://doi.org/10.1107/S0021889807021206>.
- McCoy JG., Bailey LJ., Bitto E., Bingman CA., Aceti DJ., Fox BG. & Phillips GN, Jr. (2006a) Structure and mechanism of mouse cysteine dioxygenase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **103**: (9), 3084-3089.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.0509262103>.
- McCoy JG., Bingman CA., Bitto E., Holdorf MM., Makaroff CA. & Phillips GN, Jr. (2006b) Structure of an ETHE1-like protein from *Arabidopsis thaliana*. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, **62**: (Pt 9), 964-970.  
<https://doi.org/10.1107/S0907444906020592>.
- McElheny D., Schnell JR., Lansing JC., Dyson HJ. & Wright PE. (2005) Defining the role of active-site loop fluctuations in dihydrofolate reductase catalysis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102**: (14), 5032-5037. <https://doi.org/10.1073/pnas.0500699102>.
- McFerrin MB. & Snell EH. (2002) The development and application of a method to quantify the quality of cryoprotectant solutions using standard area-detector X-ray images. *J Appl Crystallogr*, **35**: (5), 538-545.  
<https://doi.org/10.1107/S0021889802009238>.
- Méndez-García C., Peláez AI., Mesa V., Sánchez J., Golyshina OV. & Ferrer M. (2015) Microbial diversity and metabolic networks in acid mine drainage habitats. *Front Microbiol*, **6**: (475), 475.  
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00475>.
- Mercatelli E., Barbieri L., Luchinat E. & Banci L. (2016) Direct structural evidence of protein redox regulation obtained by in-cell NMR. *Biochim Biophys Acta*, **1863**: (2), 198-204.  
<https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2015.11.009>.

- Meyer AJ. & Dick TP. (2010) Fluorescent protein-based redox probes. *Antioxid Redox Signal*, **13**: (5), 621-650. <https://doi.org/10.1089/ars.2009.2948>
- Middelburg JJ. (2000) The geochemical sulfur cycle. *Environmental Technologies to Treat Sulfur Pollution Principles and Engineering*, 33-46.
- Mizoguchi TJ. & Lippard SJ. (1998) Synthetic models of the deoxy and oxy forms of the non-heme dioxygen-binding protein hemerythrin. *J Am Chem Soc*, **120**: (42), 11022-11023. <https://doi.org/10.1021/ja982417z>.
- Mol AR., S. Castro M. & Fontes W. (2018) NetWheels: A web application to create high quality peptide helical wheel and net projections. *bioRxiv*, 416347. <https://doi.org/10.1101/416347>.
- Moll R. & Schäfer G. (1988) Chemiosmotic H<sup>+</sup> cycling across the plasma membrane of the thermoacidophilic archaebacterium *Sulfolobus acidocaldarius*. *FEBS Lett*, **232**: (2), 359-363. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(88\)80769-5](https://doi.org/10.1016/0014-5793(88)80769-5).
- Montagner C., Nigen M., Jacquin O., Willet N., Dumoulin M., Karsisiotis AI., Roberts GC., Damblon C., Redfield C. & Matagne A. (2016) The Role of Active Site Flexible Loops in Catalysis and of Zinc in Conformational Stability of *Bacillus cereus* 569/H/9 beta-Lactamase. *J Biol Chem*, **291**: (31), 16124-16137. <https://doi.org/10.1074/jbc.M116.719005>.
- Morra MJ. & Dick WA. (1991) Mechanisms of H<sub>2</sub>S production from cysteine and cystine by microorganisms isolated from soil by selective enrichment. *Appl Environ Microbiol*, **57**: (5), 1413-1417. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC182963/>
- Motl N., Skiba MA., Kabil O., Smith JL. & Banerjee R. (2017) Structural and biochemical analyses indicate that a bacterial persulfide dioxygenase-rhodanese fusion protein functions in sulfur assimilation. *J Biol Chem*, **292**: (34), 14026-14038. <https://doi.org/10.1074/jbc.M117.790170>.
- Müller FH., Bandejas TM., Ulrich T., Teixeira M., Gomes CM. & Kletzin A. (2004) Coupling of the pathway of sulphur oxidation to dioxygen reduction: characterization of a novel membrane-bound thiosulphate:quinone oxidoreductase. *Mol Microbiol*, **53**: (4), 1147-1160. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2004.04193.x>.
- Murphy MP. (2012) Mitochondrial thiols in antioxidant protection and redox signaling: distinct roles for glutathionylation and other thiol modifications. *Antioxid Red Signal*, **16**: (6), 476-495. <https://doi.org/10.1089/ars.2011.4289>.
- Nesvizhskii AI., Keller A., Kolker E. & Aebersold R. (2003) A statistical model for identifying proteins by tandem mass spectrometry. *Anal Chem*, **75**: (17), 4646-4658. <https://doi.org/10.1021/ac0341261>.
- Nguyen DMN., Piel RB., Laughlin CT. & Larson TJ. (2013) Defining the role of two sulfur dioxygenases of *Azotobacter vinelandii* in sulfur trafficking. *Faseb J*, **27**: (1), [https://www.fasebj.org/doi/abs/10.1096/fasebj.27.1\\_supplement.605.1](https://www.fasebj.org/doi/abs/10.1096/fasebj.27.1_supplement.605.1)
- Niu W., Wang J., Qian J., Wang M., Wu P., Chen F. & Yan S. (2018) Allosteric control of human cystathionine beta-synthase activity by a redox active disulfide bond. *J Biol Chem*, **293**: (7), 2523-2533. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA117.000103>.
- Ogawa T., Furusawa T., Shiga M., Seo D., Sakurai H. & Inoue K. (2010) Biochemical studies of a soxF-encoded monomeric flavoprotein purified from the green sulfur bacterium *Chlorobaculum tepidum* that stimulates in vitro thiosulfate oxidation. *Biosci Biotech Bioch*, **74**: (4), 771-780. <https://doi.org/10.1271/bbb.90815>.
- Ogawa T., Noguchi K., Saito M., Nagahata Y., Kato H., Ohtaki A., Nakayama H., Dohmae N., Matsushita Y. & Odaka M. (2013) Carbonyl sulfide hydrolase from *Thiobacillus thioparus* strain THI115 is one of the  $\beta$ -carbonic anhydrase family enzymes. *J Am Chem Soc*, **135**: (10), 3818-3825. <https://doi.org/10.1021/ja307735e>
- Olson GJ., Brierley JA. & Brierley CL. (2003) Bioleaching review part B: progress in bioleaching: applications of microbial processes by the minerals industries. *Appl Microbiol Biotechnol*, **63**: (3), 249-257. <https://doi.org/10.1007/s00253-003-1404-6>.
- Osipov EM., Lilina AV., Tsallagov SI., Safonova TN., Sorokin DY., Tikhonova TV. & Popov VO. (2018) Structure of the flavocytochrome c sulfide dehydrogenase associated with the copper-binding protein CopC from the haloalkaliphilic sulfur-oxidizing bacterium *Thioalkalivibrio paradoxus* ARh 1. *Acta Crystallogr D Struct Biol*, **74**: (Pt 7), 632-642. <https://doi.org/10.1107/S2059798318005648>.
- Ouyang J., Liu Q., Li B., Ao J. & Chen X. (2013) Proteomic Analysis of Differential Protein Expression in *Acidithiobacillus ferrooxidans* Grown on Ferrous Iron or Elemental Sulfur. *Indian J Microbiol*, **53**: (1), 56-62. <https://doi.org/10.1007/s12088-012-0322-7>.
- Pachmayr F. (1961) Vorkommen und Bestimmung von Schwefelverbindungen in Mineralwasser. *Dissertation*, Universität München.
- Pantel J. (2019) Mutagenese und Oligomerisierungsstudien der Persulfid Dioxygenase aus *Acidithiobacillus caldus* Bachelor Thesis, Technische Universität Darmstadt.
- Parey K., Demmer U., Warkentin E., Wynen A., Ermler U. & Dahl C. (2013) Structural, biochemical and genetic characterization of dissimilatory ATP sulfurylase from *Allochrochromatium vinosum*. *PLoS One*, **8**: (9), e74707. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0074707>.

- Parsons S. (2003) Introduction to twinning. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, **59**: (Pt 11), 1995-2003. <https://doi.org/10.1107/s0907444903017657>.
- Peck Jr H. (1968) Energy-coupling mechanisms in chemolithotrophic bacteria. *Annual Reviews in Microbiology*, **22**: (1), 489-518.
- Pelletier N., Leroy G., Guiral M., Giudici-Orticoni MT. & Aubert C. (2008) First characterisation of the active oligomer form of sulfur oxygenase reductase from the bacterium *Aquifex aeolicus*. *Extremophiles*, **12**: (2), 205-215. <https://doi.org/10.1007/s00792-007-0119-5>.
- Peng L., Xu X., Guo M., Yan X., Wang S., Gao S. & Zhu S. (2013) Effects of metal ions and disulfide bonds on the activity of phosphodiesterase from *Trimeresurus stejnegeri venom*. *Metallomics*, **5**: (7), 920-927. <https://doi.org/10.1039/c3mt00031a>.
- Perez-Riverol Y., Csordas A., Bai J, *et al.* (2019) The PRIDE database and related tools and resources in 2019: improving support for quantification data. *Nucleic Acids Res*, **47**: (D1), D442-D450. <https://doi.org/10.1093/nar/gky1106>.
- Pettersen EF., Goddard TD., Huang CC., Couch GS., Greenblatt DM., Meng EC. & Ferrin TE. (2004) UCSF Chimera - a visualization system for exploratory research and analysis. *J Comput Chem*, **25**: (13), 1605-1612. <https://doi.org/10.1002/jcc.20084>.
- Pettinati I., Brem J., McDonough MA. & Schofield CJ. (2015) Crystal structure of human persulfide dioxygenase: structural basis of ethylmalonic encephalopathy. *Hum Mol Genet*, **24**: (9), 2458-2469. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddv007>.
- Philippot P., Van Zuilen M., Lepot K., Thomazo C., Farquhar J. & Van Kranendonk MJ. (2007) Early Archaeon microorganisms preferred elemental sulfur, not sulfate. *Science*, **317**: (5844), 1534-1537. <https://doi.org/10.1126/science.1145861>.
- Pöll U. (2016) Schwefel-Oxygenasen/-Reduktasen aus *Acidianus ambivalens* und *Halothiobacillus neapolitanus*. *Dissertation*, Technische Universität Darmstadt. <https://tuprints.ulb.tu-darmstadt.de/6578/>.
- Pott AS. & Dahl C. (1998) Sirohaem sulfite reductase and other proteins encoded by genes at the *dsr* locus of *Chromatium vinosum* are involved in the oxidation of intracellular sulfur. *Microbiol*, **144** (7), 1881-1894. <https://doi.org/10.1099/00221287-144-7-1881>.
- Price JC., Barr EW., Glass TE., Krebs C. & Bollinger JM, Jr. (2003) Evidence for hydrogen abstraction from C1 of taurine by the high-spin Fe(IV) intermediate detected during oxygen activation by taurine:alpha-ketoglutarate dioxygenase (TauD). *J Am Chem Soc*, **125**: (43), 13008-13009. <https://doi.org/10.1021/ja037400h>.
- Protze J., Müller F., Lauber K., Naß B., Mentele R., Lottspeich F. & Kletzin A. (2011) An Extracellular Tetrathionate Hydrolase from the Thermoacidophilic Archaeon *Acidianus Ambivalens* with an Activity Optimum at pH 1. *Front Microbiol*, **2**: (68), 68. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2011.00068>.
- Pu M., Xu Z., Peng Y., Hou Y., Liu D., Wang Y., Liu H., Song G. & Liu ZJ. (2018) Protein crystal quality oriented disulfide bond engineering. *Protein Cell*, **9**: (7), 659-663. <https://doi.org/10.1007/s13238-017-0482-7>.
- Pullela PK., Chiku T., Carvan MJ, 3rd. & Sem DS. (2006) Fluorescence-based detection of thiols in vitro and in vivo using dithiol probes. *Anal Biochem*, **352**: (2), 265-273. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2006.01.047>.
- Purschke WG., Schmidt CL., Petersen A. & Schäfer G. (1997) The terminal quinol oxidase of the hyperthermophilic archaeon *Acidianus ambivalens* exhibits a novel subunit structure and gene organization. *J Bacteriol*, **179**: (4), 1344-1353. <https://doi.org/10.1128/jb.179.4.1344-1353.1997>.
- Quatrini R., Appia-Ayme C., Denis Y, *et al.* (2006) Insights into the iron and sulfur energetic metabolism of *Acidithiobacillus ferrooxidans* by microarray transcriptome profiling. *Hydrometallurgy*, **83**: (1-4), 263-272. <https://doi.org/10.1016/j.hydromet.2006.03.030>.
- Quatrini R., Appia-Ayme C., Denis Y., Jedlicki E., Holmes DS. & Bonnefoy V. (2009) Extending the models for iron and sulfur oxidation in the extreme acidophile *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *BMC Genomics*, **10**: (1), 394. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-10-394>.
- Rabus R., Hansen TA. & Widdel F. (2013) Dissimilatory sulfate-and sulfur-reducing prokaryotes. *The Prokaryotes: Prokaryotic Physiology and Biochemistry*, 309-404.
- Ramachandran GN., Ramakrishnan C. & Sasisekharan V. (1963) Stereochemistry of polypeptide chain configurations. *J Mol Biol*, **7**, 95-99. [https://doi.org/10.1016/s0022-2836\(63\)80023-6](https://doi.org/10.1016/s0022-2836(63)80023-6).
- Rao GS. & Gorin G. (1959) Reaction of cystine with sodium sulfide in sodium hydroxide solution. *J Org Chem*, **24**: (6), 749-753. <https://doi.org/10.1021/jo01088a005>.
- Rawlings DE., Coram NJ., Gardner MN. & Deane SM. (1999) *Thiobacillus caldus* and *Leptospirillum ferrooxidans* are widely distributed in continuous flow biooxidation tanks used to treat a variety of metal containing ores and concentrates. *Process Metallurgy*, **9**, 777-786. [https://doi.org/10.1016/S1572-4409\(99\)80080-7](https://doi.org/10.1016/S1572-4409(99)80080-7).
- Read RJ. (1986) Improved Fourier Coefficients for Maps Using Phases from Partial Structures with Errors. *Acta Crystallogr A*, **42**: (3), 140-149. <https://doi.org/10.1107/S0108767386099622>.

- Reinartz M., Tschäpe J., Brüser T., Trüper HG. & Dahl C. (1998) Sulfide oxidation in the phototrophic sulfur bacterium *Chromatium vinosum*. *Arch Microbiol*, **170**: (1), 59-68. <https://doi.org/10.1007/s002030050615>.
- Rethmeier J., Rabenstein A., Langer M. & Fischer U. (1997) Detection of traces of oxidized and reduced sulfur compounds in small samples by combination of different high-performance liquid chromatography methods. *J Chromatogr A*, **760**: (2), 295-302. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(96\)00809-6](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(96)00809-6).
- Rodriguez J., Hiras J. & Hanson TE. (2011) Sulfite oxidation in *chlorobaculum tepidum*. *Front Microbiol*, **2**, 112. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2011.00112>.
- Rohwerder T., Gehrke T., Kinzler K. & Sand W. (2003) Bioleaching review part A: progress in bioleaching: fundamentals and mechanisms of bacterial metal sulfide oxidation. *Appl Microbiol Biotechnol*, **63**: (3), 239-248. <https://doi.org/10.1007/s00253-003-1448-7>.
- Rohwerder T. & Sand W. (2003) The sulfane sulfur of persulfides is the actual substrate of the sulfur-oxidizing enzymes from *Acidithiobacillus* and *Acidiphilium* spp. *Microbiol-Sgm*, **149**: (Pt 7), 1699-1710. <https://doi.org/10.1099/mic.0.26212-0>.
- Rohwerder T. & Sand W. (2007) Oxidation of Inorganic Sulfur Compounds in Acidophilic Prokaryotes. *Engineering in Life Sciences*, **7**: (4), 301-309. <https://doi.org/10.1002/elsc.200720204>.
- Rother D., Henrich H-J., Quentmeier A., Bardischewsky F. & Friedrich CG. (2001) Novel genes of the sox gene cluster, mutagenesis of the flavoprotein SoxF, and evidence for a general sulfur-oxidizing system in *Paracoccus pantotrophus* GB17. *Journal of bacteriology*, **183**: (15), 4499-4508. <https://doi.org/10.1128/JB.183.15.4499-4508.2001>.
- Roy AB. & Trudinger PA (1970) *The Biochemistry of Inorganic Compounds of Sulphur*. Cambridge University Press.
- Rühl P. (2015) Strukturelle und Funktionale Analysen von Schwefel-Oxygenasen/-Reduktasen. *Master-Thesis*, Technische Universität Darmstadt.
- Rühl P. & Kletzin A. (2017) The Sulfur Oxygenase Reductase Activity Assay: Catalyzing a Reaction with Elemental Sulfur as Substrate at High Temperatures. *Bio-Protoc*, **7**: (14), <https://doi.org/10.21769/BioProtoc.2403>.
- Rühl P., Pöll U., Braun J., Klingl A. & Kletzin A. (2017) A Sulfur Oxygenase from the Haloalkaliphilic Bacterium *Thioalkalivibrio paradoxus* with Atypically Low Reductase Activity. *J Bacteriol*, **199**: (4), <https://doi.org/10.1128/JB.00675-16>.
- Rühl P., Haas P., Seipel D., Becker J. & Kletzin A. (2018) Persulfide Dioxygenase From *Acidithiobacillus caldus*: Variable Roles of Cysteine Residues and Hydrogen Bond Networks of the Active Site. *Front Microbiol*, **9**: (1610), 1610. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01610>.
- Rzhapishevska OL., Valdes J., Marcinkeviciene L., Gallardo CA., Meskys R., Bonnefoy V., Holmes DS. & Dopson M. (2007) Regulation of a novel *Acidithiobacillus caldus* gene cluster involved in metabolism of reduced inorganic sulfur compounds. *Appl Environ Microbiol*, **73**: (22), 7367-7372. <https://doi.org/10.1128/AEM.01497-07>.
- Sánchez O., Ferrera I., Dahl C. & Mas J. (2001) In vivo role of adenosine-5'-phosphosulfate reductase in the purple sulfur bacterium *Allochromatium vinosum*. *Arch Microbiol*, **176**: (4), 301-305. <https://doi.org/10.1007/s002030100327>.
- Sattler SA., Wang X., Lewis KM., DeHan PJ., Park CM., Xin Y., Liu H., Xian M., Xun L. & Kang C. (2015) Characterizations of Two Bacterial Persulfide Dioxygenases of the Metallo-beta-lactamase Superfamily. *J Biol Chem*, **290**: (31), 18914-18923. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.652537>.
- Schägger H. & von Jagow G. (1987) Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal Biochem*, **166**: (2), 368-379. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(87\)90587-2](https://doi.org/10.1016/0003-2697(87)90587-2).
- Schauder R. & Kröger A. (1993) Bacterial sulphur respiration. *Arch Microbiol*, **159**: (6), 491-497. <https://doi.org/10.1007/BF00249025>.
- Scheres SH. (2015) Semi-automated selection of cryo-EM particles in RELION-1.3. *J Struct Biol*, **189**: (2), 114-122. <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2014.11.010>.
- Schrödinger L. (2015) The PyMOL Molecular Graphics System, Version 2.0. <https://pymol.org/2/>
- Searle BC. (2010) Scaffold: a bioinformatic tool for validating MS/MS-based proteomic studies. *Proteomics*, **10**: (6), 1265-1269. <https://doi.org/10.1002/pmic.200900437>.
- Sehnal D., Svobodova Varekova R., Berka K., Pravda L., Navratilova V., Banas P., Ionescu CM., Otyepka M. & Koca J. (2013) MOLE 2.0: advanced approach for analysis of biomacromolecular channels. *J Cheminform*, **5**: (1), 39. <https://doi.org/10.1186/1758-2946-5-39>.
- Seipel D. (2015) Schwefeldioxygenasen aus *Acidithiobacillus* sp. *Bachelor-Thesis*, Technische Universität Darmstadt.
- Seyfarth K. (2006) Gerichtete Mutagenese zur Funktionsbestimmung einzelner Aminosäuren aus der Schwefel Oxygenase- /Reduktase. *Diplomarbeit*, Technische Universität Darmstadt.

- Sharpe DJ. & Wong LJ. (1990) Effects of substrates on the thermal stability of nuclear histone acetyltransferase. *Biochimie*, **72**: (5), 323-326.  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2119817>
- Shen J., Keithly ME., Armstrong RN., Higgins KA., Edmonds KA. & Giedroc DP. (2015) *Staphylococcus aureus* CstB Is a Novel Multidomain Persulfide Dioxygenase-Sulfurtransferase Involved in Hydrogen Sulfide Detoxification. *Biochemistry*, **54**: (29), 4542-4554.  
<https://doi.org/10.1021/acs.biochem.5b00584>.
- Shoemaker SC. & Ando N. (2018) X-rays in the Cryo-Electron Microscopy Era: Structural Biology's Dynamic Future. *Biochemistry*, **57**: (3), 277-285.  
<https://doi.org/10.1021/acs.biochem.7b01031>.
- Simaan AJ., Döpner S., Banse F., Bourcier S., Bouchoux G., Boussac A., Hildebrandt P. & Girerd JJ. (2000) Fe<sup>III</sup>-Hydroperoxo and Peroxo Complexes with Aminopyridyl Ligands and the Resonance Raman Spectroscopic Identification of the Fe–O and O–O Stretching Modes. *Eur J Inorg Chem*, **2000**: (7), 1627-1633.  
[https://doi.org/10.1002/1099-0682\(200007\)2000:7<1627::AID-EJIC1627>3.0.CO;2-9](https://doi.org/10.1002/1099-0682(200007)2000:7<1627::AID-EJIC1627>3.0.CO;2-9)
- Skulan AJ., Brunold TC., Baldwin J., Saleh L., Bollinger JM, Jr. & Solomon EI. (2004) Nature of the peroxo intermediate of the W48F/D84E ribonucleotide reductase variant: implications for O<sub>2</sub> activation by binuclear non-heme iron enzymes. *J Am Chem Soc*, **126**: (28), 8842-8855.  
<https://doi.org/10.1021/ja049106a>.
- Soper JD., Kryatov SV., Rybak-Akimova EV. & Nocera DG. (2007) Proton-directed redox control of O–O bond activation by heme hydroperoxidase models. *J Am Chem Soc*, **129**: (16), 5069-5075.  
<https://doi.org/10.1021/ja0683032>.
- Sorokin DY., Tourova TP., Lysenko AM. & Kuenen JG. (2001) Microbial thiocyanate utilization under highly alkaline conditions. *Appl Environ Microbiol*, **67**: (2), 528-538.  
<https://doi.org/10.1128/AEM.67.2.528-538.2001>.
- Sorokin DY., Tourova TP., Lysenko AM., Mityushina LL. & Kuenen JG. (2002) *Thioalkalivibrio thiocyanoxidans* sp. nov. and *Thioalkalivibrio paradoxus* sp. nov., novel alkaliphilic, obligately autotrophic, sulfur-oxidizing bacteria capable of growth on thiocyanate, from soda lakes. *Int J Syst Evol Microbiol*, **52**: (Pt 2), 657-664.  
<https://doi.org/10.1099/00207713-52-2-657>.
- Sorokin DY., Tourova TP., Sjollema KA. & Kuenen JG. (2003) *Thiialkalivibrio nitratireducens* sp. nov., a nitrate-reducing member of an autotrophic denitrifying consortium from a soda lake. *Int J Syst Evol Microbiol*, **53**: (Pt 6), 1779-1783.  
<https://doi.org/10.1099/ijs.0.02615-0>.
- Sorokin DY. & Kuenen JG. (2005) Haloalkaliphilic sulfur-oxidizing bacteria in soda lakes. *FEMS Microbiol Rev*, **29**: (4), 685-702.  
<https://doi.org/10.1016/j.femsre.2004.10.005>.
- Sorokin DY., Banciu H., Robertson LA. & Kuenen JG. (2006) Haloalkaliphilic sulfur-oxidizing bacteria. *The Prokaryotes: Volume 2: Ecophysiology and Biochemistry*, 969-984.
- Sorokin DY., Rusanov, II., Pimenov NV., Tourova TP., Abbas B. & Muyzer G. (2010) Sulfidogenesis under extremely haloalkaline conditions in soda lakes of Kulunda Steppe (Altai, Russia). *FEMS Microbiol Ecol*, **73**: (2), 278-290.  
<https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2010.00901.x>.
- Sorokin DY., Kuenen JG. & Muyzer G. (2011) The microbial sulfur cycle at extremely haloalkaline conditions of soda lakes. *Front Microbiol*, **2**, 44.  
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2011.00044>.
- Sorokin DY., Banciu H., Robertson LA., Kuenen JG., Muntyan MS. & Muyzer G (2013) Halophilic and Haloalkaliphilic Sulfur-Oxidizing Bacteria. *The Prokaryotes*, (Rosenberg E, DeLong EF, Lory S, Stackebrandt E. & Thompson F, eds.), 529-554. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg.
- Sorokin DY., Berben T., Melton ED., Overmars L., Vavourakis CD. & Muyzer G. (2014) Microbial diversity and biogeochemical cycling in soda lakes. *Extremophiles*, **18**: (5), 791-809.  
<https://doi.org/10.1007/s00792-014-0670-9>.
- Sorokin DY., Banciu HL. & Muyzer G. (2015) Functional microbiology of soda lakes. *Curr Opin Microbiol*, **25**, 88-96.  
<https://doi.org/10.1016/j.mib.2015.05.004>.
- Sorokin DY., Messina E., La Cono V., Ferrer M., Ciordia S., Mena MC., Toshchakov SV., Golyshin PN. & Yakimov MM. (2018) Sulfur Respiration in a Group of Facultatively Anaerobic Natronoarchaea Ubiquitous in Hypersaline Soda Lakes. *Front Microbiol*, **9**: (2359), 2359.  
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02359>.
- Steudel R (2000) The chemical sulfur cycle. *Environmental technologies to treat sulfur pollution*, **1**, (Hulshof PNLL, ed.) 1-31. London.
- Steudel R. (2002) The Chemistry of Organic Polysulfanes R–S<sub>n</sub>–R (n > 2). *Chem Rev*, **102**: (11), 3905-3946.  
<https://doi.org/10.1021/cr010127m>.
- Stivala A., Wybrow M., Wirth A., Whisstock JC. & Stuckey PJ. (2011) Automatic generation of protein structure cartoons with Pro-origami. *Bioinformatics*, **27**: (23), 3315-3316.  
<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btr575>.
- Stockdreher Y., Sturm M., Josten M., Sahl HG., Dobler N., Zigann R. & Dahl C. (2014) New proteins involved in sulfur trafficking in the cytoplasm of *Allochromatium vinosum*. *J Biol Chem*, **289**: (18), 12390-12403.  
<https://doi.org/10.1074/jbc.M113.536425>.



- Sun CW., Chen ZW., He ZG., Zhou PJ. & Liu SJ. (2003) Purification and properties of the sulfur oxygenase/reductase from the acidothermophilic archaeon, *Acidianus* strain S5. *Extremophiles*, **7**: (2), 131-134. <https://doi.org/10.1007/s00792-002-0304-5>.
- Suzuki I. & Werkman CH. (1959) Glutathione and Sulfur Oxidation by *Thiobacillus Thiooxidans*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **45**: (2), 239-244. <https://doi.org/10.1073/pnas.45.2.239>
- Suzuki I. (1965a) Incorporation of atmospheric oxygen-18 into thiosulfate by the sulfur-oxidizing enzyme of *Thiobacillus thiooxidans*. *Biochim Biophys Acta*, **110**: (1), 97-101. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5865170>
- Suzuki I. (1965b) Oxidation of elemental sulfur by an enzyme system of *Thiobacillus thiooxidans*. *Biochim Biophys Acta*, **104**: (2), 359-371. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5855047>
- Suzuki I. & Silver M. (1966) The initial product and properties of the sulfur-oxidizing enzyme of thiobacilli. *Biochim Biophys Acta*, **122**: (1), 22-33. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5968172>
- Suzuki I. (1999) Oxidation of inorganic sulfur compounds: Chemical and enzymatic reactions. *Can J Microbiol*, **45**: (2), 97-105. <https://doi.org/10.1139/cjm-45-2-97>.
- Talla E., Hedrich S., Mangenot S., Ji B., Johnson DB., Barbe V. & Bonnefoy V. (2014) Insights into the pathways of iron- and sulfur-oxidation, and biofilm formation from the chemolithotrophic acidophile *Acidithiobacillus ferrivorans* CF27. *Res Microbiol*, **165**: (9), 753-760. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2014.08.002>.
- Tanaka T., Kato H., Nishioka T. & Oda J. (1992) Mutational and proteolytic studies on a flexible loop in glutathione synthetase from *Escherichia coli* B: the loop and arginine 233 are critical for the catalytic reaction. *Biochemistry*, **31**: (8), 2259-2265. <https://doi.org/10.1021/bi00123a007>.
- Taylor BF (1994) [27] Adenylylsulfate reductases from thiobacilli. *Method Enzymol*, **243**, 393-400. Elsevier.
- Tchesnokov EP., Faponle AS., Davies CG., Quesne MG., Turner R., Fellner M., Souness RJ., Wilbanks SM., de Visser SP. & Jameson GN. (2016) An iron-oxygen intermediate formed during the catalytic cycle of cysteine dioxygenase. *Chem Commun (Camb)*, **52**: (57), 8814-8817. <https://doi.org/10.1039/c6cc03904a>.
- Terwilliger TC., Grosse-Kunstleve RW., Afonine PV., Moriarty NW., Zwart PH., Hung LW., Read RJ. & Adams PD. (2008) Iterative model building, structure refinement and density modification with the PHENIX AutoBuild wizard. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, **64**: (Pt 1), 61-69. <https://doi.org/10.1107/S090744490705024X>.
- Thauer RK., Jungermann K. & Decker K. (1977) Energy conservation in chemotrophic anaerobic bacteria. *Bacteriol Rev*, **41**: (1), 100-180. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/860983>
- Thauer RK., Kaster AK., Seedorf H., Buckel W. & Hedderich R. (2008) Methanogenic archaea: ecologically relevant differences in energy conservation. *Nat Rev Microbiol*, **6**: (8), 579-591. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1931>.
- Tikhonova TV., Sorokin DY., Hagen WR., Khrenova MG., Muyzer G., Rakitina TV., Shabalin IG., Trofimov AA., Tsallagov SI. & Popov VO. (2020) Trinuclear copper biocatalytic center forms an active site of thiocyanate dehydrogenase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. <https://doi.org/10.1073/pnas.1922133117>.
- Tindall BJ. (1988) Prokaryotic life in the alkaline, saline, athalassic environment. *Halophilic bacteria*, **1**, 31-67.
- Tiranti V., D'Adamo P., Briem E., Ferrari G., Mineri R., Lamantea E., Mandel H., Balestri P., Garcia-Silva M-T. & Vollmer B. (2004) Ethylmalonic encephalopathy is caused by mutations in ETHE1, a gene encoding a mitochondrial matrix protein. *The Am J Hum Genet*, **74**: (2), 239-252. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1181922/pdf/AJHGv74p239.pdf>
- Tiranti V., Briem E., Lamantea E, *et al.* (2006) ETHE1 mutations are specific to ethylmalonic encephalopathy. *J Med Genet*, **43**: (4), 340-346. <https://doi.org/10.1136/jmg.2005.036210>.
- Tiranti V., Viscomi C., Hildebrandt T, *et al.* (2009) Loss of ETHE1, a mitochondrial dioxygenase, causes fatal sulfide toxicity in ethylmalonic encephalopathy. *Nat Med*, **15**: (2), 200-205. <https://doi.org/10.1038/nm.1907>.
- Toohy JI. (2011) Sulfur signaling: is the agent sulfide or sulfane? *Anal Biochem*, **413**: (1), 1-7. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2011.01.044>.
- Tsai Y., Sawaya MR., Cannon GC., Cai F., Williams EB., Heinhorst S., Kerfeld CA. & Yeates TO. (2007) Structural analysis of CsoS1A and the protein shell of the *Halothiobacillus neapolitanus* carboxysome. *PLoS Biol*, **5**: (6), e144. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0050144>.
- Tsallagov S., Tikhonova T., Sorokin D., Kletzin A. & Popov V. (2015) "Thiocyanate dehydrogenase" is a novel copper enzyme of the primary thiocyanate degradation in haloalkaliphilic sulfur-oxidizing bacterium *Thioalkalivibrio paradoxus* ARh1". *Proceedings of the EMBO Workshop on Microbial Sulfur Metabolism*
- Urich T., Bandejas TM., Leal SS., Rachel R., Albrecht T., Zimmermann P., Scholz C., Teixeira M., Gomes CM. & Kletzin A. (2004) The sulphur oxygenase reductase from *Acidianus ambivalens* is a multimeric protein containing a low-potential mononuclear non-haem iron centre. *Biochem J*, **381**: (Pt 1), 137-146. <https://doi.org/10.1042/BJ20040003>.

- Urich T. (2005) The Sulfur Oxygenase Reductase from *Acidianus ambivalens* - Functional and Structural Characterization of a Sulfur-Disproportionating Enzyme. *Dissertation*, Technische Universität Darmstadt. <http://elib.tu-darmstadt.de/diss/000615>.
- Urich T., Coelho R., Kletzin A. & Frazão C. (2005a) The sulfur oxygenase reductase from *Acidianus ambivalens* is an icosatetramer as shown by crystallization and Patterson analysis. *Biochim Biophys Acta*, **1747**: (2), 267-270. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2004.11.015>.
- Urich T., Kroke A., Bauer C., Seyfarth K., Reuff M. & Kletzin A. (2005b) Identification of core active site residues of the sulfur oxygenase reductase from *Acidianus ambivalens* by site-directed mutagenesis. *FEMS Microbiol Lett*, **248**: (2), 171-176. <https://doi.org/10.1016/j.femsle.2005.05.031>.
- Urich T., Gomes CM., Kletzin A. & Frazão C. (2006) X-ray Structure of a self-compartmentalizing sulfur cycle metalloenzyme. *Science*, **311**: (5763), 996-1000. <https://doi.org/10.1126/science.1120306>.
- Vagin A. & Lebedev A. (2015) MoRDa, an automatic molecular replacement pipeline. *Acta Crystallographica Section A Foundations and Advances*, **71**: (a1), 19. <https://doi.org/10.1107/s2053273315099672>.
- Valdés J., Pedroso I., Quatrini R. & Holmes DS. (2008) Comparative genome analysis of *Acidithiobacillus ferrooxidans*, *A. thiooxidans* and *A. caldus*: Insights into their metabolism and ecophysiology. *Hydrometallurgy*, **94**: (1-4), 180-184. <https://doi.org/10.1016/j.hydromet.2008.05.039>.
- Vavourakis CD., Andrei AS., Mehrshad M., Ghai R., Sorokin DY. & Muyzer G. (2018) A metagenomics roadmap to the uncultured genome diversity in hypersaline soda lake sediments. *Microbiome*, **6**: (1), 168. <https://doi.org/10.1186/s40168-018-0548-7>.
- Veith A. (2011) Sulfur Oxygenase Reductases - A Structural and Biochemical Perspective, *Dissertation*, Technische Universität Darmstadt. <https://tubiblio.ulb.tu-darmstadt.de/54692/>.
- Veith A., Urich T., Seyfarth K., Protze J., Frazão C. & Kletzin A. (2011) Substrate pathways and mechanisms of inhibition in the sulfur oxygenase reductase of *Acidianus ambivalens*. *Front Microbiol*, **2**, 37. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2011.00037>.
- Veith A., Botelho HM., Kindinger F., Gomes CM. & Kletzin A. (2012) The sulfur oxygenase reductase from the mesophilic bacterium *Halothiobacillus neapolitanus* is a highly active thermozyme. *J Bacteriol*, **194**: (3), 677-685. <https://doi.org/10.1128/JB.06531-11>.
- Venceslau SS., Cort JR., Baker ES., Chu RK., Robinson EW., Dahl C., Saraiva LM. & Pereira IA. (2013) Redox states of *Desulfovibrio vulgaris* DsrC, a key protein in dissimilatory sulfite reduction. *Biochem Biophys Res Commun*, **441**: (4), 732-736. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2013.10.116>.
- Villar-Acevedo G., Lugo-Mas P., Blakely MN., Rees JA., Ganas AS., Hanada EM., Kaminsky W. & Kovacs JA. (2017) Metal-Assisted Oxo Atom Addition to an Fe(III) Thiolate. *J Am Chem Soc*, **139**: (1), 119-129. <https://doi.org/10.1021/jacs.6b03512>.
- Villaume I., Thomas D. & Legoy MD. (1990) Catalysis May Increase the Stability of an Enzyme - the Example of Horse Liver Alcohol-Dehydrogenase. *Enzyme Microb Tech*, **12**: (7), 506-509. [https://doi.org/10.1016/0141-0229\(90\)90066-Y](https://doi.org/10.1016/0141-0229(90)90066-Y).
- Visser JM., Robertson LA., Van Verseveld HW. & Kuenen JG. (1997) Sulfur production by obligately chemolithoautotrophic *Thiobacillus* species. *Appl Environ Microbiol*, **63**: (6), 2300-2305. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16535627>.
- Volkamer A., Kuhn D., Grombacher T., Rippmann F. & Rarey M. (2012) Combining global and local measures for structure-based druggability predictions. *J Chem Inf Model*, **52**: (2), 360-372. <https://doi.org/10.1021/ci200454v>.
- Vonck J. & Mills DJ. (2017) Advances in high-resolution cryo-EM of oligomeric enzymes. *Curr Opin Struct Biol*, **46**, 48-54. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2017.05.016>.
- Wagner T., Koch J., Ermler U. & Shima S. (2017) Methanogenic heterodisulfide reductase (HdrABC-MvhAGD) uses two noncubane [4Fe-4S] clusters for reduction. *Science*, **357**: (6352), 699-703. <https://doi.org/10.1126/science.aan0425>.
- Wakai S., Kikumoto M., Kanao T. & Kamimura K. (2004) Involvement of sulfide:quinone oxidoreductase in sulfur oxidation of an acidophilic iron-oxidizing bacterium, *Acidithiobacillus ferrooxidans* NASF-1. *Biosci Biotechnol Biochem*, **68**: (12), 2519-2528. <https://doi.org/10.1271/bbb.68.2519>.
- Wang H., Liu S., Liu X., Li X., Wen Q. & Lin J. (2014) Identification and characterization of an ETHE1-like sulfur dioxygenase in extremely acidophilic *Acidithiobacillus* spp. *Appl Microbiol Biotechnol*, **98**: (17), 7511-7522. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-5830-4>.
- Wang ZB., Li YQ., Lin JQ., et al. (2016) The Two-Component System RsrS-RsrR Regulates the Tetrathionate Intermediate Pathway for Thiosulfate Oxidation in *Acidithiobacillus caldus*. *Front Microbiol*, **7**: (1755), 1755. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01755>.

- Wasmund K., Musmann M. & Loy A. (2017) The life sulfuric: microbial ecology of sulfur cycling in marine sediments. *Environ Microbiol Rep*, **9**: (4), 323-344. <https://doi.org/10.1111/1758-2229.12538>.
- Waterhouse A., Bertoni M., Bienert S, *et al.* (2018) SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures and complexes. *Nucleic Acids Res*, **46**: (1), 296-303. <https://doi.org/10.1093/nar/gky427>.
- Weissgerber T., Sylvester M., Kröninger L. & Dahl C. (2014) A Comparative Quantitative Proteomic Study Identifies New Proteins Relevant for Sulfur Oxidation in the Purple Sulfur Bacterium *Allochroamatium vinosum*. *Appl Environ Microbiol*, **80**: (7), 2279-2292. <https://doi.org/10.1128/AEM.04182-13>.
- Welte C., Hafner S., Krätzer C., Quentmeier A., Friedrich CG. & Dahl C. (2009) Interaction between Sox proteins of two physiologically distinct bacteria and a new protein involved in thiosulfate oxidation. *FEBS Lett*, **583**: (8), 1281-1286. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2009.03.020>.
- Wenzel NF., Carenbauer AL., Pfister MP., Schilling O., Meyer-Klaucke W., Makaroff CA. & Crowder MW. (2004) The binding of iron and zinc to glyoxalase II occurs exclusively as di-metal centers and is unique within the metallo- $\beta$ -lactamase family. *J Biol Inorg Chem*, **9**: (4), 429-438. <https://doi.org/10.1007/s00775-004-0535-2>.
- Winkler JR. & Gray HB. (2015) Electron flow through biological molecules: does hole hopping protect proteins from oxidative damage? *Q Rev Biophys*, **48**: (4), 411-420. <https://doi.org/10.1017/S0033583515000062>.
- Winn MD., Ballard CC., Cowtan KD, *et al.* (2011) Overview of the CCP4 suite and current developments. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, **67**: (Pt 4), 235-242. <https://doi.org/10.1107/S0907444910045749>.
- Winterbourn CC. (2015) Are free radicals involved in thiol-based redox signaling? *Free Radic Biol Med*, **80**, 164-170. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2014.08.017>.
- Wittig I. & Schagger H. (2005) Advantages and limitations of clear-native PAGE. *Proteomics*, **5**: (17), 4338-4346. <https://doi.org/10.1002/pmic.200500081>.
- Wood AP., Woodall CA. & Kelly DP. (2005) *Halothiobacillus neapolitanus* strain OSA isolated from "The Old Sulphur Well" at Harrogate (Yorkshire, England). *Syst Appl Microbiol*, **28**: (8), 746-748. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2005.05.013>.
- Wood JL. (1987) Sulfane sulfur. *Methods Enzymol*, **143**, 25-29. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3657542>
- Wu W., Pang X., Lin J., Liu X., Wang R., Lin J. & Chen L. (2017) Discovery of a new subgroup of sulfur dioxygenases and characterization of sulfur dioxygenases in the sulfur metabolic network of *Acidithiobacillus caldus*. *PLoS One*, **12**: (9), e0183668. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0183668>.
- Xia Y., Lu C., Hou N., Xin Y., Liu J., Liu H. & Xun L. (2017) Sulfide production and oxidation by heterotrophic bacteria under aerobic conditions. *ISME J*, **11**: (12), 2754-2766. <https://doi.org/10.1038/ismej.2017.125>.
- Xin Y., Liu H., Cui F., Liu H. & Xun L. (2016) Recombinant *Escherichia coli* with sulfide:quinone oxidoreductase and persulfide dioxygenase rapidly oxidises sulfide to sulfite and thiosulfate via a new pathway. *Environ Microbiol*, **18**: (12), 5123-5136. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.13511>.
- Yang J., Yan R., Roy A., Xu D., Poisson J. & Zhang Y. (2015) The I-TASSER Suite: protein structure and function prediction. *Nature methods*, **12**: (1), 7-8. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3213>.
- Yin H., Zhang X., Li X, *et al.* (2014) Whole-genome sequencing reveals novel insights into sulfur oxidation in the extremophile *Acidithiobacillus thiooxidans*. *BMC Microbiol*, **14**: (1), 179. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-14-179>.
- You X., Meng Z., Chen D., Guo X., Zeyer J., Liu S. & Jiang C. (2012) Structural Basis for the Thermostability of Sulfur Oxygenase Reductases. *Chin J Chem Eng*, **20**: (1), 52-61. [https://doi.org/10.1016/s1004-9541\(12\)60363-2](https://doi.org/10.1016/s1004-9541(12)60363-2).
- You XY., Guo X., Zheng HJ, *et al.* (2011) Unraveling the *Acidithiobacillus caldus* complete genome and its central metabolisms for carbon assimilation. *J Genet Genomics*, **38**: (6), 243-252. <https://doi.org/10.1016/j.jgg.2011.04.006>.
- Zafeiriou DI., Augoustides-Savvopoulou P., Haas D, *et al.* (2007) Ethylmalonic encephalopathy: clinical and biochemical observations. *Neuropediatrics*, **38**: (2), 78-82. <https://doi.org/10.1055/s-2007-984447>.
- Zhang H., Guo W., Xu C., Zhou H. & Chen X. (2013a) Site-specific mutagenesis and functional analysis of active sites of sulfur oxygenase reductase from Gram-positive moderate thermophile *Sulfobacillus acidophilus* TPY. *Microbiol Res*, **168**: (10), 654-660. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2013.04.008>.
- Zhang J., Ye ZW., Singh S., Townsend DM. & Tew KD. (2018) An evolving understanding of the S-glutathionylation cycle in pathways of redox regulation. *Free Radic Biol Med*, **120**, 204-216. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2018.03.038>.
- Zhang K. (2016) Gctf: Real-time CTF determination and correction. *J Struct Biol*, **193**: (1), 1-12. <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2015.11.003>.

- 
- Zhang L., Liu X., Liu J. & Zhang Z. (2013b)**  
Characteristics and function of sulfur dioxygenase in Echiuran worm *Urechis unicinctus*. *PLoS One*, **8**: (12), e81885. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0081885>.
- Zhang W., Zheng W., Mao M. & Yang Y. (2014)**  
Highly efficient folding of multi-disulfide proteins in superoxidizing *Escherichia coli* cytoplasm. *Biotechnol Bioeng*, **111**: (12), 2520-2527. <https://doi.org/10.1002/bit.25309>.
- Zhao N., Pang B., Shyu CR. & Korkin D. (2011)**  
Charged residues at protein interaction interfaces: unexpected conservation and orchestrated divergence. *Protein Sci*, **20**: (7), 1275-1284. <https://doi.org/10.1002/pro.655>.
- Zheng SQ., Palovcak E., Armache JP., Verba KA., Cheng Y. & Agard DA. (2017)** MotionCor2: anisotropic correction of beam-induced motion for improved cryo-electron microscopy. *Nature methods*, **14**: (4), 331-332. <https://doi.org/10.1038/nmeth.4193>.
- Zillig W., Yeats S., Holz I., Bock A., Rettenberger M., Gropp F. & Simon G. (1986)** *Desulfurolobus Ambivalens*, *Gen-Nov*, *Sp-Nov*, an Autotrophic Archaeobacterium Facultatively Oxidizing or Reducing Sulfur. *Syst Appl Microbiol*, **8**: (3), 197-203. [https://doi.org/10.1016/S0723-2020\(86\)80077-7](https://doi.org/10.1016/S0723-2020(86)80077-7).
- Zimmermann P., Laska S. & Kletzin A. (1999)** Two modes of sulfite oxidation in the extremely thermophilic and acidophilic archaeon *Acidianus ambivalens*. *Arch Microbiol*, **172**: (2), 76-82. <https://doi.org/10.1007/s002030050743>
- Zivanov J., Nakane T., Forsberg BO., Kimanius D., Hagen WJ., Lindahl E. & Scheres SH. (2018)** New tools for automated high-resolution cryo-EM structure determination in RELION-3. *Elife*, **7**, e42166. <https://doi.org/10.7554/eLife.42166>.

---

## Anhang

---

Ergänzende Informationen/Daten sind auf einem beiliegenden Datenträger zusammengefasst. Nachfolgend ist eine Übersicht über die darin enthaltenen Inhalte aufgeführt:

### Schwefel\_und\_Persulfid\_Dioxygenasen\_Ruehl\_Anhang.pdf

- Ergänzende Abbildungen und Tabellen -

---

#### Kapitel 3

Abb. S-3.1	Analyse von AcPDO Cystein-Varianten mittels MalPEG Gel Shift Assay.	S.2
Abb. S-3.2	Kalibrationsgeraden von $R_f$ -Werten der denaturierenden und nicht-denaturierenden Polyacrylamidgelelektrophorese.	S.3
Abb. S-3.3	Strukturelle Darstellung von TypI-PDO Proteinuntereinheiten basierend auf ihren kristallographisch flexiblen Bereichen.	S.3
Abb. S-3.4	Modellierte GSSH-Bindungszustände an das katalytische Eisenzentrum.	S.4

#### Kapitel 6

Tab. S-6.1	<i>Aa</i> SOR Tetramer-Kanal.	S.5
Abb. S-6.1	Radiusverlauf des <i>Aa</i> SOR Tetramerkanals und strukturelle Darstellung.	S.5
Tab. S-6.2	Eingang zum aktiven Zentrum über die $M_{296}/M_{297}$ Pore der <i>Aa</i> SOR.	S.6
Abb. S-6.2	Radiusverlauf des <i>Aa</i> SOR Tunnels zum aktiven Zentrum über die $M_{296}/M_{297}$ Pore und strukturelle Darstellung.	S.6
Tab. S-6.3	Alternativer Eingang zum aktiven Zentrum über den $Zn^{2+}$ -Kanal/Css <sub>31</sub> -Kanal der <i>Aa</i> SOR.	S.7
Abb. S-6.3	Radiusverlauf des <i>Aa</i> SOR Tunnels zum aktiven Zentrum über den $Zn^{2+}$ -Kanal/Css <sub>31</sub> -Kanal und strukturelle Darstellung.	S.7
Tab. S-6.4	<i>Aa</i> SOR Trimer-Kanal.	S.8
Abb. S-6.4	Radiusverlauf des <i>Aa</i> SOR Trimerkanals und strukturelle Darstellung.	S.8
Tab. S-6.5	<i>Hn</i> SOR Tetramer-Basistunnel.	S.9
Abb. S-6.5	Radiusverlauf des <i>Hn</i> SOR Tetramer-Basistunnels und strukturelle Darstellung.	S.9
Tab. S-6.6	Eingang zum aktiven Zentrum über die $M_{302}/M_{303}$ Pore der <i>Hn</i> SOR.	S.10
Abb. S-6.6	Radiusverlauf des <i>Hn</i> SOR Tunnels zum aktiven Zentrum über die $M_{302}/M_{303}$ Pore und strukturelle Darstellung.	S.10
Tab. S-6.7	Eingang zum aktiven Zentrum über den $Zn^{2+}$ -Kanal/Css <sub>33</sub> -Kanal der <i>Hn</i> SOR.	S.11
Tab. S-6.8	<i>Hn</i> SOR Hinterausgang, gekoppelt an den Trimer-Kanal	S.12
Abb. S-6.8	Radiusverlauf des an den Trimer-Kanal-gekoppelten Hinterausgangs in der <i>Hn</i> SOR und strukturelle Darstellung.	S.12
Tab. S-6.9	<i>Hn</i> SOR Hinterausgang (1), gekoppelt an die äußere Oberfläche	S.13
Abb. S-6.9	Radiusverlauf des an den <i>Hn</i> SOR-Hinterausgangs (1), gekoppelt an die äußere Oberfläche und strukturelle Darstellung.	S.13
Tab. S-6.10	<i>Hn</i> SOR Hinterausgang (2), gekoppelt an die äußere Oberfläche.	S.14
Abb. S-6.10	Radiusverlauf des an den <i>Hn</i> SOR-Hinterausgangs (2), gekoppelt an die äußere Oberfläche und strukturelle Darstellung.	S.15
Tab. S-6.11	<i>Hn</i> SOR Trimer-Kanal.	S.16
Abb. S-6.11	Radiusverlauf des an den <i>Hn</i> SOR-Trimerkanals und strukturelle Darstellung.	S.16
Abb. S-6.12	Darstellung der C-C-Abstände der Aminosäuren des Tetramerkanals in <i>Aa</i> SOR und <i>Hn</i> SOR.	S.17

---

#### Kapitel 7

Abb. S-7.1	qRT-PCR Amplifikationsplots ausgewählter Schwefelmetabolismus-assoziiierter Gene nach Kultivierung von <i>Tv. paradoxus</i> mit Thiosulfat bzw. Thiocyanat zu verschiedenen Zeitpunkten.	S.18
------------	--	------

---

---

## 3D-Strukturen

- Noch nicht öffentlich zugängliche Röntgenkristall- und Kryo-EM-Strukturen -

---

### Röntgenkristallstrukturen

#### **AcPDO**

AcPDO.pdb	Röntgenkristallstruktur der nativen AcPDO
AcPDO.mtz	Dazugehörige Elektronendichtekarte
AcPDO_GSH.pdb	Röntgenkristallstruktur der AcPDO nach GSH-Inkubation
AcPDO_GSH.mtz	Dazugehörige Elektronendichtekarte
AcPDO_GSSH.pdb	Röntgenkristallstruktur der AcPDO nach GSSH-Inkubation
AcPDO_GSSH.mtz	Dazugehörige Elektronendichtekarte
AcPDO_GSSH_SOX_Modell.pdb	AcPDO-Kristallstruktur nach GSSH-Docking mit modelliertem Superoxid
AcPDO_Tetramer.pdb	AcPDO Tetramer zusammengesetzt aus zwei asymmetrischen Einheiten

#### **TpSOR**

TpSOR.pdb	Röntgenkristallstruktur der nativen TpSOR
TpSOR.mtz	Dazugehörige Elektronendichtekarte
TpSOR_Holo.pdb	TpSOR-Holoenzym zusammengesetzt aus drei asymmetrischen Einheiten

---

### Kryo-EM-Strukturen

#### **AaSOR**

AaSOR_Kryo_A.pdb	Kryo-EM-Struktur einer AaSOR Untereinheit
AaSOR_Kryo_Holo.pdb	Kryo-EM-Struktur des AaSOR Holoenzym
AaSOR_Kryo.mrc	Dazugehörige Elektronendichtekarte

#### **TpSOR**

TpSOR_Kryo_A.pdb	Kryo-EM-Struktur einer TpSOR Untereinheit
TpSOR_Kryo_Holo.pdb	Kryo-EM-Struktur des TpSOR Holoenzym
TpSOR_Kryo.mrc	Dazugehörige Elektronendichtekarte

---

Die Daten basieren auf dem in dieser Arbeit beschriebenen Stand des *Refinements*. Zur Visualisierung der 3D-Strukturen und der dazugehörigen Elektronendichtekarten werden die Programme PyMOL, Chimera, Yasara oder COOT empfohlen.

## Nukleotidalalignments

- Nukleotidalalignments aller im Rahmen dieser Arbeit erstellten Enzymvarianten -

Dateien im \*.pdf-Format zeigen die Sequenzierungsergebnisse der jeweiligen mutagenisierten Gene, ausgerichtet gegenüber dem Wildtyp. Dateien im \*.txt-Format entsprechen jeweils den Alignments und können beispielsweise mit den Programmen Unipro UGENE oder BioEdit visualisiert werden.

## Proteom

- Ergänzende Daten zur Proteomstudie in *Tv. paradoxus* Arh 1 -

### Proteomstudie\_Tv\_paradoxus\_Arh1.xlsx

Prozessierte Rohdaten der Proteomstudie, inklusive Bezeichnung von Schwefelproteinen der *Heat maps*, PDB-Blast, Transmembran- und Signalpeptidanalyse.

### KEGG Pathways

Übersicht über Veränderungen der Proteinabundanzen aus KEGG-Pathways. Dateien im \*.png-Format. Für eine Übersicht der Bezeichnungen der einzelnen *pathways*, siehe beigefügte Datei Übersicht\_KEGG\_Pathways.pdf



---

# Abkürzungsverzeichnis

---

Abkürzungen gängiger molekularbiologische Definitionen und SI-Einheiten sind gemäß den Vorgaben der *American Society for Microbiology*<sup>8</sup> nicht im Abkürzungsverzeichnis aufgeführt.

$\Delta G$	freie Bindungsenergie
3D	dreidimensional
Å	Angström
AaSOR	Schwefel Oxygenase Reduktase aus <i>Acidianus ambivalens</i>
Abb.	Abbildung
<i>Ac. ambivalens</i>	<i>Acidianus ambivalens</i>
<i>Ac. brierleyi</i>	<i>Acidianus brierleyi</i>
<i>Ac. tengchongensis</i>	<i>Acidianus tengchongensis</i>
AcPDO	Persulfid Dioxygenase aus <i>Acidithiobacillus caldus</i>
ad	auffüllen auf
a.d.p.s	<i>Atomic Displacement Parameters</i>
AHT	Anhydrotetracyclin
Akt.	Aktivität
<i>Al. vinosum</i>	<i>Allochromatium vinosum</i>
Amp	Ampicillin
APBS	<i>Adaptive Poisson-Boltzmann Solver</i>
APR	Adenosin-5'-phosphosulfat Reduktase
APS	Ammoniumpersulfat
<i>Aq. Aeolicus</i>	<i>Aquifex aeolicus</i>
ArPDO	Persulfid Dioxygenase aus <i>Arabidopsis thaliana</i>
<i>At. caldus</i>	<i>Acidithiobacillus caldus</i>
<i>At. ferrooxidans</i>	<i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i>
AtSOR	Schwefel Oxygenase Reduktase aus <i>Acidianus tengchongensis</i>
AU	Absorptionseinheiten ( <i>absorbance units</i> )
BSA	Rinderserumalbumin, Bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CaCl <sub>2</sub>	Calciumchlorid
CD	Circulardichroismus
CDO	Cystein Dioxygenase
CID	<i>Collision Induced Dissociation</i>
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
CoCl <sub>2</sub>	Cobalchlorid
CopC	Kupferresistenzprotein
COS	Carbonyl-Sulfid
CQ	Caldariella-Chinon
CS <sub>2</sub>	Kohlenstoff-Disulfid
Css	Cysteinpersulfid
C <sub>T</sub>	Schwellwertzyklus ( <i>cycle of threshold</i> )
C-Terminus	Carboxy-Terminus
CuCl <sub>2</sub>	Kupferchlorid
CV	Säulenvolumen ( <i>column volume</i> )
Da	Dalton
DDA	<i>Data Dependent Aquisition</i>
ddH <sub>2</sub> O	doppelt deionisiertes Wasser
dH <sub>2</sub> O	einfach deionisiertes Wasser
DHAP	Dihydroxyacetophenon
DLS	dynamische Lichtstreuung
DNAPI	DNA-Polymerase I
dNTP	Desoxynukleosid-Triphosphat
DSF	<i>Differential Scanning Fluorimetry</i>
Dsr	dissimilatorische Sulfat-Reduktase
DTT	Dithiothreitol
e <sup>-</sup>	Elektron(en)
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
E <sub>0</sub> '	Standardredoxpotential

---

<sup>8</sup> <https://jb.asm.org/>

---

EE	Ethylmalonsäure Enzephalopathie
EM	Elektronenmikroskopie
EPR	Elektronenspinresonanz ( <i>Electron Paramagnetic Resonance</i> )
ESI	Elektrospray Ionisation
ESP	elektrostatisches Oberflächenpotential ( <i>Electrostatic Surface Potential</i> )
et al.	<i>et alii</i> (und andere)
Fcc(B)	Flavocytochrom c Sulfid Dehydrogenase (B)
Fe	Eisen
FPLC	schnelle Proteinflüssigchromatographie ( <i>fast protein liquid chromatography</i> )
<i> fwd</i>	<i>forward</i>
FWHM	<i>Full Width Half Maximum</i>
<i> g</i>	Gravitationsfeldstärke
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat Dehydrogenase
GHcySH	$\gamma$ -Glutamyl-Homocysteinyl-Glycin
Gl.	Gleichung
GLXII	Glyoxalasen II
GO	<i>Gene Ontology</i>
GPC	Gelpermeationschromatographie, Gelfiltration
GSH	reduziertes Glutathion
GSSG	oxidiertes Glutathion
GSSH	Glutathion Persulfid
<i> H. neapolitanus</i>	<i>Halothiobacillus neapolitanus</i>
H <sup>+</sup>	Wasserstoff
H <sub>2</sub> O	Wasser
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
H <sub>2</sub> S	Schwefelwasserstoff
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	Borsäure
HABA	Hydroxy-Azophenyl Benzoessäure
HCl	Salzsäure
Hdr	Heterodisulfid Reduktase
hETHE	humanes Ethylmalonsäure Enzephalopathie Protein 1
<i> HnSOR</i>	Schwefel Oxygenase Reduktase aus <i>Halothiobacillus neapolitanus</i>
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie ( <i>high performance liquid chromatography</i> )
HRP	Meerrettichperoxidase ( <i>Horseradish peroxidase</i> )
HSO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	Sulfit
I	Intensität
IAA	Iodacetamid
ID	Identifikationsnummer
IPA	Isopropylalkohol
IPNS	Isopenicillin N Synthase
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid
K	Kelvin
k	Ratenkonstante
Kap.	Kapitel
K <sub>av</sub>	Verteilungskoeffizient
kcal	Kilokalorien
K <sub>cat</sub>	Wechselzahl
k <sub>D</sub>	Dissoziationskonstante
kDa	Kilodalton
KEGG	<i>Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes</i>
kJ	Kilojoule
K <sub>m</sub>	Michaelis-Konstante
kV	Kilovolt
LB	<i>lysogeny broth</i>
LC	Flüssigkeitschromatographie ( <i>liquid chromatopgraphy</i> )
log <sub>10</sub>	dekadischer Logarithmus
Lsg.	Lösung
<i> m/z</i>	Masse-zu-Ladung-Verhältnis
mA	Milliampere
MALDI	Matrix-Assistierte Laser-Desorption-Ionisierung
MalPEG	Methoxypolyethylenglykol Maleimid Polyethylenglycol
mAU	Milliabsorptionseinheiten
mBBr	Monobrombiman
MES	2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid

---

---

MnCl <sub>2</sub>	Manganchlorid
M <sub>r</sub>	Molekulargewicht
MS	Massenspektrometrie
MST	<i>Microscale Thermophoresis</i>
mV	Millivolt
MW	Molekulargewicht
MxPDO	Persulfid Dioxygenase aus <i>Myxococcus xanthus</i>
Na <sup>+</sup>	Natrium
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Dinatriumhydrogenphosphat
NaCl	Natriumchlorid
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Natriumdihydrogenphosphat
NaMoO <sub>4</sub>	Natriummolybdat
NaOH	Natriumhydroxid
nb	nicht bestimmt
NEM	N-Ethylmaleinimid
NG	native Gelelektrophorese
n <sub>H</sub>	Hill-Koeffizient
NiCl <sub>2</sub>	Nickelchlorid
N-Terminus	Amino-Terminus
o	ortho
O <sub>(2)</sub>	Sauerstoff
OD	Optische Dichte
OH <sup>-</sup>	Hydroxyion
OMP	äußeres Membranprotein ( <i>Outer Membrane Protein</i> )
Opt.	Optimum
Ox.	Oxygenase
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
PC	Hauptkomponente ( <i>principal component</i> )
PCA	Hauptkomponentenanalyse ( <i>principal component analysis</i> )
PCI	Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol
PDB	Proteindatenbank
PDO	Persulfid Dioxygenase
PEG	Polyethylenglycol
pH	<i>potentia hydrogenii</i>
pka	Säurekonstante
ppm	Anteile pro Million ( <i>parts per million</i> )
PpPDO	Persulfid Dioxygenase aus <i>Paraburkholderia phytofirmans</i>
Präp.	Präparation(en)
Psr	Polysulfidreduktase
PVDF	Polyvinylidenfluorid
qRT PCR	Quantitative Reverse-Transkriptase PCR
r.m.s.d.	mittleres Abweichungsquadrat ( <i>root mean square deviation</i> )
rDsr	oxidative/reverse dissimilatorische Sulfit-Reduktase
Red.	Reduktase
rev	<i>reverse</i>
R <sub>f</sub>	relativer Mobilitätskoeffizient
R <sub>free</sub>	<i>Free R factor</i>
R <sub>meas</sub>	<i>Redundancy-independent merging R factor</i>
RP	Umkehrphase ( <i>reversed phase</i> )
R <sub>pim</sub>	<i>Precision indicating merging R factor</i>
rpm	Umdrehungen pro Minute ( <i>revolutions per minute</i> )
RpoB	RNA-Polymerase B
R <sub>sym</sub>	<i>Merging R value</i>
RuBisCO	Ribulose-1,5-bisphosphat-carboxylase /-oxygenase
R <sub>work</sub>	<i>Working R factor</i>
s.	siehe
S <sup>0</sup>	elementarer Schwefel
S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> <sup>2-</sup>	Thiosulfat
SAOR	Sulfit-Akzeptor Oxidoreduktase
Sat	Adenosin Triphosphat Sulfurylase
SCN	Thiocyanat
SDO	Schwefel Dioxygenase
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SH	Thiolgruppe

---

---

SO <sub>2</sub>	Schwefeldioxid
SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	Sulfat
Soe	Sulfit-oxidierendes Enzym
SOR	Schwefel Oxygenase Reduktase
Sox	Schwefel Oxidationskomplex
sp.	Spezies
spez.	spezifisch
spp.	Spezies (Plural)
SQR	Sulfid-Chinon Oxidoreduktase
SWATH	<i>Sequential Window Acquisition of all Theoretical Fragment Ion Spectra</i>
T	Temperatur
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA
Tat	Twin-Arginin Transportsystem
Tau	Zeitkonstante
TauD	Taurin-Dioxygenase
TBE	Tris-Borat-EDTA
TCA	Trichloressigsäure
TcDH	Thiocyanat Dehydrogenase
TCEP	Tris(2-carboxyethyl)phosphin
TE	Tris-EDTA
TEM	Transmissions-Elektronenmikroskopie
TEMED	Tetramethylethylendiamin
tet	Tetrazyklin
TetH	Tetrathionat Hydrolase
TFA	Trifluoressigsäure
T <sub>m</sub>	Schmelzpunkt
TOF	<i>Time of flight</i>
T <sub>opt</sub>	Temperaturoptimum
TpSOR	Schwefel Oxygenase Reduktase aus <i>Thioalkalivibrio paradoxus</i>
TPTZ	2,4,6-Tripyridyl-s-1,3,5-triazin
TQO	Thiosulfat-Chinon Oxidoreduktase
TusA	Schwefelüberträgerprotein
<i>Tv. nitrati-reducens</i>	<i>Thioalkalivibrio nitrati-reducens</i>
<i>Tv. paradoxus</i>	<i>Thioalkalivibrio paradoxus</i>
Tween 20	Polyoxyethylen(20)-sorbitan-monolaurat
U	Einheiten ( <i>Units</i> )
v/v	<i>volume per volume</i>
V <sub>0</sub>	Totvolumen
V <sub>c</sub>	Säulenvolumen
V <sub>e</sub>	Retentionsvolumen
vs.	<i>versus</i> (gegen)
vgl.	vergleiche
Vis	<i>visible</i>
V <sub>max</sub>	Maximale Reaktionsgeschwindigkeit
w/v	<i>weight per volume</i>
Wt	Wildtyp
X	Röntgenkristallographie
Zn	Zink
ZnSO <sub>4</sub>	Zinksulfat
λ	Wellenlänge
σ	Signalrauschen

---

---

## Beiträge anderer

---

Die in dieser Arbeit präsentierten Daten wurden mit folgenden Ausnahmen von mir erstellt, analysiert und ausgewertet:

### Kapitel 3:

Die massenspektrometrischen Analysen des AcPDO-Holoenzym wurden an der TU-Darmstadt in der MS-Abteilung des Fachbereichs Chemie von Christiane Rudolph durchgeführt. MALDI-TOF MS Analysen Trypsin-gespaltener Peptidfragmente erfolgten in der MS-Abteilung der Universität Hohenheim und wurden von Dr. Jens Pfannstiel durchgeführt. Die Proteinkristallisation der AcPDO und EPR-Messungen erfolgten am ITQB in Oeiras (Portugal), wobei die Analyse und Bearbeitung der Rohdaten, *Phasing*, sowie die Erstellung der initialen Elektronendichtekarten und Strukturmodelle von Dr. Carlos Frazão durchgeführt wurde. EPR-Messungen wurden in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. Miguel Teixeira und Dr. Filipe Folgosa ebenfalls am ITQB durchgeführt. *Stopped-Flow* Spektren wurden in Zusammenarbeit mit Dr. Daniel Tietze aus dem Arbeitskreis Buntkowsky an der TU Darmstadt durchgeführt. Das hETHE1-Plasmid wurde von Prof. Dr. Cláudio Gomes (Universität Lissabon) zur Verfügung gestellt. Plasmide der AcPDO-Cystein-Varianten, mit Ausnahme von C<sub>87</sub>A und C<sub>117</sub>S, wurden von Dipl. Biol. Patrick Haas während seiner Diplomarbeit generiert. Plasmide der AcPDO-Varianten R<sub>190</sub>A, sowie E<sub>55</sub>A, E<sub>55</sub>D und N<sub>221</sub>A wurden von Philip Kemp bzw. Josefine Panthel im Rahmen ihrer Bachelor-Thesis unter meiner Anleitung erstellt. In Zusammenarbeit mit Josefine Panthel erfolgten ebenfalls die Substratbindungsanalysen im Rahmen ihrer Bachelor-Thesis.

### Kapitel 4:

CD-Spektroskopien wurden von Philipp Czechowski aus dem Arbeitskreis Reggelin an der TU Darmstadt durchgeführt.

### Kapitel 5:

Die Proteinkristallisation der TpSOR erfolgte am ITQB in Oeiras (Portugal), wobei initiale Analysen der Rohdaten, analog zur Darstellung in Kapitel 3, von Dr. Carlos Frazão durchgeführt wurden. EPR-Messungen erfolgten ebenfalls in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. Miguel Teixeira und Dr. Filipe Folgosa am ITQB. Kryo-EM-Strukturen wurden von Dr. Kristian Parey, Dr. Janet Vonck und Dr. Deryck Mills erstellt. Dr. Janet Vonck und Dr. Deryck Mills führten dabei die Datensammlung, die Bildverarbeitung und die initiale Anpassung an die Elektronendichtekarte auf Basis der bereits vorhandenen Röntgenkristallstrukturdaten durch.

### Kapitel 6:

Die Probenvorbereitung für MALDI-TOF-Analysen wurden von Nathanael Weber im Rahmen eines Masterpraktikums unter meiner Anleitung durchgeführt. Die Messungen erfolgten an der TU Darmstadt in der MS-Abteilung des Fachbereichs Chemie von Gül Sahinalp.

### Kapitel 7:

Teile der *Tv. paradoxus*-Wachstumskurven wurden von Sandro Hoffmann im Rahmen eines Masterpraktikums unter meiner Anleitung durchgeführt. SEM-Analysen erfolgten in Zusammenarbeit mit Dr. Nathalie Benker aus dem Institut für Anwandte Geowissenschaften der TU Darmstadt. SWATH-LC-MS/MS-Analysen wurden von Dr. Christof Lenz aus der Forschungsgruppe Massenspektrometrie des Max-Planck-Institutes für biophysikalische Chemie durchgeführt. Datenanalysen erfolgten in Zusammenarbeit mit Dr. Sascha Hein an der TU Darmstadt.

---

## Publikationen

---

Ergebnisse dieser Arbeit wurden bereits in folgenden wissenschaftlichen Publikationen veröffentlicht:

**Rühl P., Pöll U., Braun J., Klingl A. & Kletzin A. (2017)** A Sulfur Oxygenase from the Haloalkaliphilic Bacterium *Thioalkalivibrio paradoxus* with Atypically Low Reductase Activity. *J Bacteriol*, **199**: (4), <https://doi.org/10.1128/JB.00675-16>.

**Rühl P. & Kletzin A. (2017)** The Sulfur Oxygenase Reductase Activity Assay: Catalyzing a Reaction with Elemental Sulfur as Substrate at High Temperatures. *Bio-Protocol*, **7**: (14), <https://doi.org/10.21769/BioProtoc.2403>.

**Rühl P., Haas P., Seipel D., Becker J. & Kletzin A. (2018)** Persulfide Dioxygenase From *Acidithiobacillus caldus*: Variable Roles of Cysteine Residues and Hydrogen Bond Networks of the Active Site. *Front Microbiol*, **9**: (1610), 1610. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01610>.



---

## Konferenzbeiträge

---

Ergebnisse dieser Arbeit wurden bereits auf folgenden nationalen und internationalen Kongressen präsentiert.

### Wissenschaftliche Vorträge

VAAM-Jahrestagung 2019, Mainz, Deutschland

“Persulfide Dioxygenase From *Acidithiobacillus caldus*: Variable Roles of Cysteine Residues and Hydrogen Bond Networks of the Active Site”

**P. Rühl\***, D. Tietze, F. Folgosa, M. Teixeira, C. Frazão, A. Kletzin

5th International Symposium on Microbial Sulfur Metabolism 2018, Wien, Österreich

“Microbial Sulfur Oxygenases – with and without Reductase Activities”

A. Kletzin\*, **P. Rühl**, T. Urich, A. Veith, U. Pöll, C. Frazão

### Posterpräsentationen

VAAM-Jahrestagung 2020, Leipzig, Deutschland

"Sulfur and Nitrogen Metabolism in Aerobically Growing *Thioalkalivibrio paradoxus*: A Proteome study"

**P. Rühl**, S. Hein, N. Benker, A. Kletzin\*, C. Lenz

"Microbial Sulfur Oxygenase Reductases: Structure, Identification of Reaction Intermediates and Implications for the Reaction Mechanism"

A. Kletzin\*, **P. Rühl**, K. Parey, R. Coelho, J. Vonck, C. Frazão

VAAM-Jahrestagung 2019, Mainz, Deutschland

“A Sulfur Oxygenase from the Haloalkaliphilic Bacterium *Thioalkalivibrio paradoxus* with Atypically Low Reductase Activity”

**P. Rühl**, F. Folgosa, M. Teixeira, C. Frazão, A. Kletzin\*

VAAM-Jahrestagung 2018, Wolfsburg, Deutschland

„Persulfide Dioxygenase From *Acidithiobacillus caldus* – Identification of essential cysteine residues by mutagenesis, modification analysis and X-ray crystallography”

**P. Rühl\***, P. Haas, D. Seipel, F. Folgosa, C. Frazão, A. Kletzin

VAAM-Jahrestagung 2017, Würzburg, Deutschland

“A Sulfur Oxygenase from the Haloalkaliphilic Bacterium *Thioalkalivibrio paradoxus* with Atypically Low Reductase Activity”

**P. Rühl\***, U. Pöll, J. Braun, A. Klingl, A. Kletzin

VAAM-Jahrestagung 2016, Jena, Deutschland

“A Sulfur Oxygenase from the Haloalkaliphilic Bacterium *Thioalkalivibrio paradoxus* with almost no Low Reductase Activity”

**P. Rühl\***, U. Pöll, J. Braun, A. Klingl, A. Kletzin

„The Effect of Point Mutations on the Activity of the Glutathione-dependent, ETHE1-like Sulfur Dioxygenase from *Acidithiobacillus caldus*”

P. Haas\*, **P. Rühl**, D. Seipel, M. Bernhard, D. Gleditsch, A. Kletzin

\*, Vortragender

---

# *Curriculum Vitae*

---

## Persönliche Daten

---

Name: Patrick Rühl  
Geburtsdatum: 23.07.1990  
Geburtsort: Langen (Hessen)

## Akademische Ausbildung

---

seit 10/2015	<b>Promotion</b> im Fachbereich Mikrobiologie, TU Darmstadt
10/2013 – 09/2015	<b>Masterstudium Technische Biologie (M. Sc.)</b> , TU Darmstadt Abschlussarbeit: <i>Strukturelle und funktionale Analysen von Schwefel Oxygenasen Reduktasen</i>
10/2010 – 07/2013	<b>Bachelorstudium Biologie (B. Sc.)</b> , TU Darmstadt Abschlussarbeit: <i>Mutationsanalyse der Schwefel Oxygenase Reduktase aus Acidianus ambivalens</i>
09/2018 – 10/2018 10/2017 – 12/2017	<b>Internationale Forschungsaufenthalte</b> (Instituto de Tecnologia Química e Biológica; ITQB), Oeiras, Portugal

## Schulische Ausbildung

---

08/2007 – 06/2010      **Abitur**, Dreieichschule Langen

## Stipendien

---

10/2017 – 12/2017	<b>FEMS Forschungsstipendium</b> der Vereinigung für Allgemeine und Angewandte Mikrobiologie
10/2015 – 10/2017	<b>Hubert-Markl Promotionsstipendium</b> der Carlo und Karin Giersch- Stiftung
10/2014 – 09/2015	<b>Deutschlandstipendium</b> für begabte und leistungsstarke Studierende

---

## Danksagung

---

„Wenn ich weiter sehen konnte, so deshalb, weil ich auf den Schultern von Riesen stand.“

- Isaac Newton -

Obwohl auf dem Titel dieser Arbeit nur ein Name steht bildeten viele Personen ein Fundament, welches maßgeblich zu ihrem Gelingen beigetragen hat und denen ich hiermit meinen Dank aussprechen möchte.

Mein besonderer Dank gilt Dr. Arnulf Kletzin, der mich von meinen ersten Schritten in der Wissenschaft bis hin zur Fertigstellung meiner Dissertation permanent begleitet und geprägt hat. Dabei hat er mir stets viel Freiraum bei der Gestaltung meines Themas gewährt und immer Zeit für konstruktive und hilfreiche Diskussionen gefunden.

Prof. Dr. Felicitas Pfeifer möchte ich an dieser Stelle für die vielen wertvollen Gespräche über die große Welt der Mikroorganismen und die Begutachtung dieser Arbeit danken.

Ein großer Dank gebührt Dr. Carlos Frazão, der mich während meiner Aufenthalte am ITQB jederzeit herzlich empfangen und mir in kürzester Zeit die grundlegenden Prinzipien der Proteinkristallographie vermittelt hat.

Darüber hinaus möchte ich meinen vielzähligen Kooperationspartnern danken, die allesamt einen wichtigen Teil zu der vorliegenden Arbeit beigetragen haben. Im Einzelnen sind hier Prof. Dr. Miguel Teixeira und Dr. Filipe Folgosa (ITQB) für die Zusammenarbeit bei der EPR-Spektroskopie, Dr. Daniel Tietze (TU Darmstadt) für die Unterstützung in der *Stopped-Flow*-Spektroskopie und die vielen hilfreichen und interessanten Diskussionen, Dr. Christof Lenz (MPI Göttingen) für die Erhebung der *Tv. paradoxus*-Proteomdaten, Dr. Kristian Parey, Dr. Janet Vonck und Dr. Deryck Mills (MPI Frankfurt) für die Kryo-EM-Aufnahmen, Dr. Jens Pfannstiel (Universität Hohenheim), Christiane Rudolph, Gül Sahinalp und Dr. Alexander Schießler (TU Darmstadt) für die MS-Analysen von PDO und SOR, Dr. Nathalie Benker (TU Darmstadt) für die SEM-Aufnahmen, Prof. Dr. Cláudio Gomes (Universität Lissabon) für die Zurverfügungstellung des hETHE1-Plasmids und Philipp Czechowski (TU Darmstadt) für die Durchführung der CD-Spektroskopie zu nennen. Dr. Sascha Hein (TU Darmstadt) möchte ich in dem Zusammenhang nicht nur für die Hilfe bei der statistischen Auswertung der Proteomdaten, sondern auch für die unzähligen Stunden vor der HPLC danken, die er zusammen mit mir verbracht hat.

Den Mitgliedern der Arbeitsgruppen Simon, Pfeifer und Kletzin gilt ein großer Dank für jegliche Hilfestellungen und die zahlreichen Gespräche, sowohl fachlich als auch privat. Genannt seien hier vor allem Dr. Gerald Losensky, Johannes Born, Kerstin Völkner, Alisa Jost und Dr. Uwe Pöll, die alle zu einer tollen Arbeitsatmosphäre und einer unvergesslichen Zeit beigetragen haben. Insbesondere möchte ich Patrick Haas hervorheben, mit dem ich nicht nur den „Büroplatz“, sondern auch zu großen Teilen das Labor teilen durfte.

Ein weiterer Dank richtet sich an die Mitglieder der *Macromolecular Crystallography Unit* am ITQB, die mich sehr gut aufgenommen haben und jederzeit hilfsbereit waren. Obrigado a todos!

Der Carlo und Karin Giersch-Stiftung und der Vereinigung für Allgemeine und Angewandte Mikrobiologie (FEMS) danke ich für ihre finanzielle Unterstützung in Teilen dieser Arbeit.

Von ganzem Herzen danke ich meiner Freundin Sabrina Völkel sowie meinen Eltern und meinem Opa für ihre Unterstützung, ihr Verständnis und ihren Rückhalt während der Promotion, während des Studiums und noch weit darüber hinaus!

---

## Ehrenwörtliche Erklärung

---

Die vorliegende Arbeit wurde unter der Leitung von Herrn PD Dr. rer. nat. Arnulf Kletzin im Fachbereich Biologie, Fachgebiet Mikrobiologie und Archaea, der Technischen Universität Darmstadt in der Zeit von Oktober 2015 bis März 2020 angefertigt. Ein Teil der Arbeit wurde am Instituto de Tecnologia Química e Biológica (ITQB), Oeiras, Portugal, in der Arbeitsgruppe von Dr. Carlos Frazão und Prof. Miguel Teixeira im Rahmen einer Kooperation durchgeführt.

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit entsprechend den Regeln guter wissenschaftlicher Praxis selbstständig und ohne unzulässige Hilfe Dritter angefertigt habe. Sämtliche aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sowie sämtliche von Anderen direkt oder indirekt übernommenen Daten, Techniken und Materialien sind als solche kenntlich gemacht. Die Arbeit wurde bisher bei keiner anderen Hochschule zu Prüfungszwecken eingereicht. Die eingereichte elektronische Version stimmt mit der schriftlichen Version überein.

Darmstadt, den 17.03.2020

Patrick Rühl